

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rolf Müller

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

---

**Identifizierung von neuen Faktoren des Gbp2-assoziierten  
mRNA-Exports und Untersuchungen  
an mRNA-bindenden Proteinen im Modellorganismus  
*Saccharomyces cerevisiae*.**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Melanie Christiane Janning aus Meppen

Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
22.05.2017

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Frau Prof Dr. Heike Krebber

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. Roland Lill

MEINER FAMILIE

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Zusammenfassung</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>Summary</b>   | <b>3</b>  |
| <b>3</b> | <b>Einleitung</b>  | <b>4</b>  |
| 3.1      | Der Kernporenkomplex ("nuclear core complex", NPC)                 | 4         |
| 3.2      | Transport durch den NPC  | 6         |
| 3.3      | mRNA-Export  | 11        |
| 3.4      | SR-Proteine  | 16        |
| <b>4</b> | <b>Material und Methoden</b>                                       | <b>20</b> |
| 4.1      | Geräte und Verbrauchsmaterialien                                   | 20        |
| 4.2      | Chemikalien  | 21        |
| 4.3      | Stämme   | 22        |
| 4.3.1    | <i>Escherichia coli</i> -Stämme                                    | 22        |
| 4.3.2    | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme                            | 22        |
| 4.4      | Plasmide   | 23        |
| 4.5      | Oligonukleotide  | 25        |
| 4.6      | Enzyme   | 26        |
| 4.7      | Reaktions- und Nachweissysteme                                     | 27        |
| 4.8      | Computerprogramme und Datenbanken                                  | 27        |
| 4.9      | Kultivierung von Bakterien und Hefen                               | 27        |
| 4.9.1    | Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>                           | 27        |
| 4.9.2    | Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                   | 28        |
| 4.10     | Methoden zur in vitro Rekombination von DNA                        | 30        |
| 4.10.1   | Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>             | 30        |
| 4.10.1.1 | Miniplasmid_Isolierung   | 30        |
| 4.10.1.2 | Midi-Säulenpräparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> | 31        |
| 4.10.2   | DNA-Konzentrationsbestimmung                                       | 31        |
| 4.10.3   | Analyse von DNA durch Agarosegelelektrophorese                     | 31        |
| 4.10.4   | DNA-Reinigung  | 32        |
| 4.10.5   | Polymerasekettenreaktion   | 33        |
| 4.10.6   | TOPO-TA-Klonierung   | 34        |
| 4.10.7   | Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen                    | 34        |
| 4.10.8   | Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden                                | 35        |
| 4.10.9   | Herstellen von stumpfen DNA-Enden                                  | 35        |
| 4.10.10  | Ligation   | 35        |
| 4.10.11  | Transformation   | 36        |



|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 4.10.11.1 | Herstellung ultrakompetenter <i>Escherichia coli</i>   | 36        |
| 4.10.11.2 | Transformation mit Plasmid-DNA   | 37        |
| 4.10.12   | DNA-Sequenzierung  | 37        |
| 4.10.13   | Konstruktion der verwendeten Plasmide  | 37        |
| 4.11      | Methoden mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>   | 39        |
| 4.11.1    | Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>   | 39        |
| 4.11.2    | Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mit Plasmid-DNA   | 40        |
| 4.11.3    | Fluoreszenz-Mikroskopie  | 41        |
| 4.11.3.1  | Lokalisation von GFP-fusionierten Proteinen  | 41        |
| 4.11.3.2  | DNA-Färbung mit DAPI   | 42        |
| 4.11.3.3  | Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) zum Nachweis von mRNA  | 42        |
| 4.11.3.4  | Auswertung am Fluoreszenzmikroskop   | 43        |
| 4.11.4    | Sporulation und Tetradenanalyse  | 44        |
| 4.12      | Proteinbiochemische Methoden   | 44        |
| 4.12.1    | Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)  | 44        |
| 4.12.2    | Coomassie-Färbung  | 45        |
| 4.13      | Proteinexpression in <i>Escherichia coli</i>   | 46        |
| 4.13.1    | Induktion der Proteinexpression  | 46        |
| 4.13.2    | Bakterienaufschluss unter nativen Bedingungen  | 47        |
| 4.13.3    | Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie   | 47        |
| <b>5</b>  | <b>Ergebnisse</b>  | <b>48</b> |
| 5.1       | Nab2-Domänen-Tausch  | 48        |
| 5.2       | Identifizierung von Proteinen, die in den Export Gbp2-gebundener mRNAs involviert sind.  | 53        |
| 5.2.1     | Identifizierung von möglichen Exportmutanten   | 54        |
| 5.2.2     | Charakterisierung der identifizierten Exportmutanten   | 54        |
| 5.2.3     | Identifikation des mutierten Faktors   | 61        |
| 5.2.3.1   | Eine Mutation in <i>MTR4</i> ist für den Phänotyp von ts 139 verantwortlich  | 62        |
| 5.2.3.2   | <i>PRP8</i> wird als mutiertes Gen in ts 153 identifiziert   | 64        |
| 5.2.4     | Die <i>mtr4</i> -Mutation in pHK585 führt zu nukleären Lokalisation der zytoplasmatischen Versionen der SR-Proteine Gbp2, Npl3 und Hrb1. | 65        |
| 5.3       | Die Toxizität von Gbp2 in Überexpression ist nicht auf ein Zellkompartiment beschränkt.  | 67        |
| 5.4       | Expression von Hrb1 und Hrb1-S46A  | 70        |
| <b>6</b>  | <b>Diskussion</b>  | <b>75</b> |
| 6.1       | Nab2-Domänen-Tausch  | 75        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 6.2      | Identifizierung von Proteinen, die in den Export Gbp2-gebundener mRNAs involviert sind.                                 | 78        |
| 6.2.1    | <i>MRT4</i> und <i>PRP8</i> konnte als Faktoren identifiziert werden, die den Export Gbp2-assoziierte mRNAs verhindern. | 78        |
| 6.3      | Die Toxizität von Gbp2 in Überexpression ist nicht auf ein Zellkompartiment beschränkt                                  | 82        |
| <b>7</b> | <b>Literaturverzeichnis</b>   | <b>84</b> |
| <b>8</b> | <b>Anhang</b>   | <b>96</b> |
| 8.1      | Abkürzungen   | 96        |
| 8.2      | Verzeichnis akademischer Lehrer   | 98        |
| 8.3      | Danksagung  | 99        |

## 1 Zusammenfassung

Die räumliche und zeitliche Trennung von RNA- und Proteinsynthese in eukaryotischen Zellen bietet eine Menge Möglichkeiten für Kontrolle und Regulation dieser Vorgänge. Gleichzeitig erfordert dies eine funktionierende Maschinerie, die den korrekten Ablauf beider Prozesse und den Transport zwischen den Kompartimenten regelt. Fehler in diesen Abläufen führen unter anderen zu neurodegenerativen Krankheiten und hämatologischen und soliden Tumoren. Viele dieser Prozesse sind hochkonserviert und konnten durch Arbeiten an dem Modellmechanismus *Saccharomyces cerevisiae* besser verstanden werden.

In dieser Arbeit werden verschiedene, mRNA-bindende und zwischen beiden Kompartimenten pendelnde Proteine in *S. cerevisiae* charakterisiert. Dabei wurde unter Verwendung einer zytoplasmatischen Variante des SR-ähnlichen Proteins Gbp2 (gbp2(S15A)-GFP) nach Exportfaktoren gesucht, die den Export Gbp2 assoziierter mRNAs beeinflussen. 33 durch EMS-Mutagenese erzeugte, temperatur-sensitive Mutanten wurden untersucht. Es konnten dabei das mit dem TRAMP-Komplex assoziierte Protein Mtr4 und der Spleißingfaktor Prp8 als Faktoren identifiziert werden. *GBP2* ist nicht essentiell, allerdings ist eine Überexpression von *GBP2* toxisch und führt zu einer nukleären Akkumulation von poly(A)<sup>+</sup>-RNA. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Toxizität unabhängig von der Lokalisation in beiden Zellkompartimenten ist, da sowohl die zytoplasmatische Variante (gbp2(S13/15/17A)) als auch das vorwiegend nukleär lokalisierte Gbp2 in Überexpression toxisch sind. Gbp2 ist daher möglicherweise bei Prozessen auf beiden Seiten der Kernmembran beteiligt. In der Tat konnten anderen Arbeiten nachweisen, dass Gbp2 im Zellkern ein wichtiger Kontrollfaktor für fehlerhaft gespleißte mRNAs ist und dass dafür die Assoziation sowohl mit Spleißingfaktoren als auch mit dem TRAMP-Komplex wichtig ist.

Nab2 ist ein essentielles, mRNA-bindendes, pendelndes Protein, dass mit dem mRNA-Exportfaktor Mex67 interagiert. Der in dieser Arbeit hergestellten Mutante (nab2Δ200-249) fehlt die Bindestelle für den Importrezeptor Kap104. Diese Mutante kann einen temperatursensitiven Defekt von *NAB2* (*nab2-21*) nicht ersetzen. Des Weiteren zeigte diese Mutante im Gegensatz zu Nab2 eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation, da vermutlich der Import der Mutante durch das Fehlen der Kap104-Bindestelle eingeschränkt ist. Mittels Lokalisationsstudien dieser Nab2-Variante in verschiedenen

Mutationsstämmen konnte gezeigt werden, dass der Export von nab2 $\Delta$ 200-249, von funktionierendem mRNA Export abhängt, allerdings ist eine Ubiquitinierung durch Tom1 für den Export von nab2 $\Delta$ 200-249 im Gegensatz zu Nab2 keine Voraussetzung.

## 2 Summary

The separation of RNA- and proteinsynthesis by space and time provides the opportunity for an individual regulation of these processes, but it also demands a functioning machinery which ensures that the processes are performed correctly. Defects in mRNA processing are for example known to be involved in the pathophysiology of neurodegenerative disease and cancer. Basic components are often conserved between *Saccharomyces cerevisiae* and mammalian cells.

This work focuses on mRNA-binding proteins in *S. cerevisiae*, that shuttle between the nucleus and the cytoplasm. A cytoplasmic variant of the SR-like protein Gbp2 (gbp2(S15A)-GFP) was used in an attempt to identify specific factors and functions that are associated with the mRNA-export of Gbp2. In an EMS mutagenesis screen, 33 temperature-sensitive mutants were analyzed for gbp2(S15A)-GFP-export defects. Mtr4, with is associated with the TRAMP-complex and involved in nuclear surveillance of faulty mRNA and the splicing protein Prp8 were identified as factors that influence export of gbp2 associated mRNAs. *GBP2* is not essential, but overexpression is toxic and leads to a nuclear accumulation of poly(A)<sup>+</sup>-RNA. This work shows, that both the cytoplasmic variant (gbp2(S13/15/17A)) and Gbp2, which is mainly localized in the nucleus at steady state are toxic for the cells. Hence, Gbp2 possibly has a function in both compartments. And indeed later work could show that Gbp2 is an import factor in the surveillance of spliced mRNAs and it marks faulty spliced mRNA for degradation at the nuclear exosome via TRAMP and Mtr4.

Nab2 is an essential, shuttling, mRNA-binding protein that interacts with the export receptor Mex67. A Nab2 variant that lacks the binding domain for the import receptor Kap104 was generated (nab2 $\Delta$ 200-249). This mutant fails to replace the temperature-sensitive *NAB2* strain (*nab2-21*). Presumably because of the impaired import of this mutant the location was cytoplasmic at steady state compared to the mainly nuclear localization of wild type Nab2. Localization studies of nab2 $\Delta$ 200-249 in different mutant strains revealed that export of nab2 $\Delta$ 200-249 is dependent on the functional mRNA export since the protein remains in the nucleus in strains with defective *MEX67* (*mex67-5*) and in *rat7-1*, which lead to accumulation of mRNA in the nucleus. Also in contrast to Nab2 the export of nab2 $\Delta$ 200-249 is independent of ubiquitination by Tom1.

### 3 Einleitung

Wenn Proteine nicht funktionieren, weil sie etwa falsch oder gar nicht gebildet werden können, kann dies weitgreifenden Folgen für die Zelle haben. Es ist deshalb wichtig, dass diese Vorgänge gut kontrolliert und gesteuert werden. Die räumliche und zeitliche Trennung von RNA- und Proteinsynthese in eukaryotischen Zellen bietet die Möglichkeit für Regulation und Kontrolle dieser Vorgänge. Das Verständnis der mRNA als einfacher Vermittler zwischen Gentranskription und Proteintranslation ist längst überholt. Immer mehr wird deutlich, dass auch auf RNA-Ebene ganz entscheidend in die Regulation des Proteoms eingegriffen wird.

Für eine Reihe von Krankheiten konnte gezeigt werden, dass z.B. Fehler bei der Prozessierung des 3' oder 5'-Endes, beim Spleißen, bei der Translation oder bei der Stabilisierung von mRNA für den entsprechenden pathologischen Phänotyp verantwortlich sind. Zum Beispiel führt die destabilisierte mRNA von NF-L, einem Bestandteil von Neurofilamenten, bei der Amyotrophen Lateral Sklerose zur Aggregation dieser, was pathophysiologische Grundlage dieser Erkrankung ist (Thyagarajan et al., 2007). In vielen soliden Tumoren und auch hämatologischen Neoplasien sind Spleißingfaktoren dereguliert (da Silva et al., 2015; Komeno et al., 2015). Unter anderem konnten SR-Proteinkinasen als mögliches, neues therapeutisches Target z.B. in Kopf-Halstumoren und beim Mammakarzinom identifiziert werden (Radhakrishnan et al., 2016; Yoshida et al., 2015). Viele dieser Erkenntnisse sind durch Untersuchungen an dem Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* (der Bäckerhefe) gewonnen worden. Die meisten Prozesse sind in allen Eukaryoten hoch konserviert.

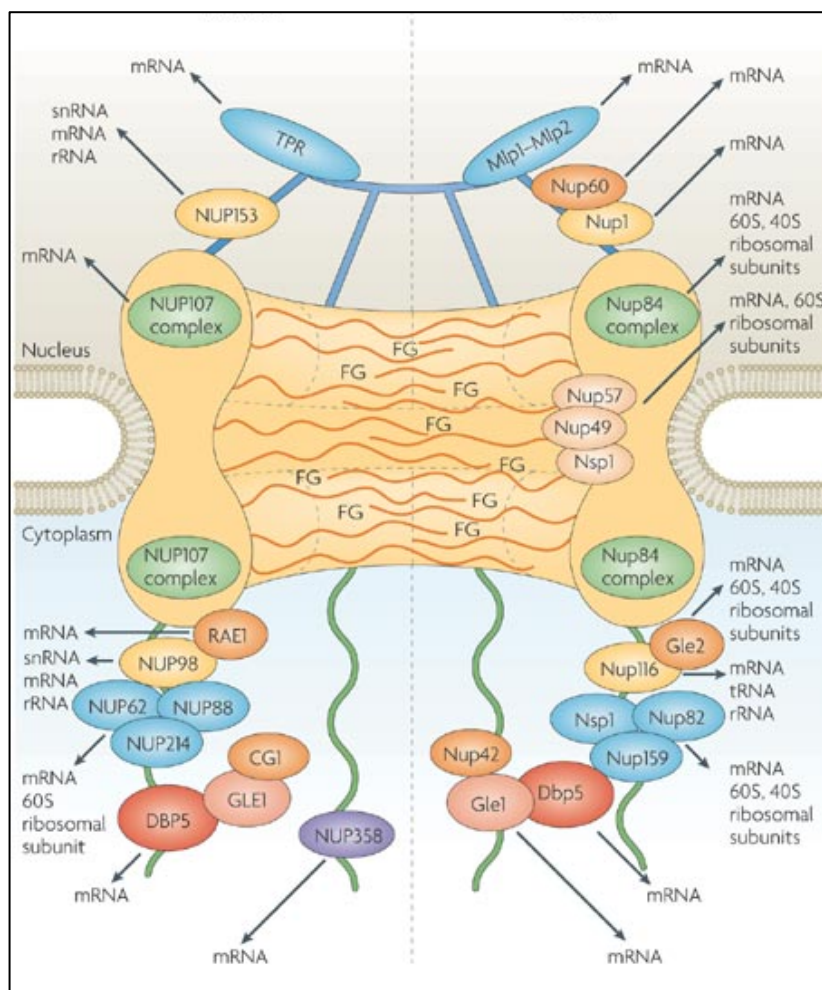
Der nukleozytoplasmatische Transport beschreibt den bidirektionalen Austausch von Molekülen, die in den jeweiligen Kompartimente benötigt werden und zwischen dem Kern und dem Zytoplasma mit dem Kernporenkomplex als Tor zwischen beiden Kompartimenten (Lim und Fahrenkrog, 2006). In den folgenden Kapiteln sollen zunächst die allgemeinen Grundlagen des nukleozytoplasmatischen Transportes durch den Kernporenkomplex vorgestellt werden, bevor der mRNA-Transport näher beschrieben wird.

#### 3.1 Der Kernporenkomplex („nuclear pore complex“, NPC)

Der NPC ist mit einer Größe etwa 125 MDa in Wirbeltieren und 66 MDa in Hefe eine der größten Strukturen der Zelle (Reichelt et al., 1990; Rout und Blobel, 1993). In

logarithmisch wachsenden Hefezellen gibt es etwa 200 NPCs, bei Wirbeltieren etwa 2000 NPCs pro Zellkern und die grundlegende Struktur ist von Hefen zu Metazoen konserviert (Fahrenkrog und Aebi, 2003; Rout et al., 2000). Etwa 30 verschiedene Proteine, sogenannte Nukleoporeine (Nups), bilden ein oktagonales, rotationssymmetrisches Grundgerüst. In Anlehnung an dieses liegen die Nups in achtfacher, sechszehnfacher oder entsprechend höherer Kopienzahl vor. Der zentrale Speichenkomplex ist in die Kernmembran eingebettet und besteht aus acht peripheren Proteinstrukturen, die einen zylindrischen Transportkanal bilden. Auf zytoplasmatischer Seite schließen sich acht Proteinfilamente und auf nukleärer Seite eine korbähnliche Struktur („nuclear basket“) an (Abb. 1) (Floch et al., 2014a; Rout et al., 2000; Wentz und Rout, 2010).

Nups werden in drei Gruppen eingeteilt: Die integralen Membranproteine verankern den NPC mit der Kernmembran. Die zweite Gruppe der Nups bilden die Strukturproteine des NPCs, die für Aufbau und Stabilität verantwortlich sind. Zu dieser Gruppe gehört unter anderem Nup170 (Nup155 in Wirbeltieren) und der Nup84-Komplex (Nup107 in Wirbeltieren). Die FG-Nukleoporeine füllen mit ihren Phenylalanin-Glycin-



**Abb. 1. Struktur des NPCs.**

Schematische Darstellung der einzelnen Subkomplexe und Nukleoporeine im Metazoen-NPC (links) und die jeweiligen Homologe im NPC von *S. cerevisiae* (rechts). Schwarze Pfeile weisen auf die einzelnen Transportwege hin, in welche die entsprechenden Komponenten involviert sind. Gelb: zentraler Speichenkomplex, blau: „nuklear basket“, grün: zytoplasmatische Proteinfilamente (aus Kohler und Hurt, 2007).

(FG)-Wiederholungselemente als Bindestelle für Nucleoporine den Transportkanal aus und dienen als Bindestelle für pendelnde Transportfaktoren wie z.B. den Proteinimportrezeptor Importin  $\beta$  oder den mRNA Exportfaktor TAP (Kap95 bzw. Mex67 in *S. cerevisiae*) und sind direkte Vermittler des nukleozytoplasmatischen Transports (Wente und Rout, 2010). Die meisten NUPs sind symmetrisch auf beiden Seiten des NPCs angeordnet. Von den wenigen Ausnahmen, die nur auf einer Seite zu finden sind, wird angenommen, dass sie entweder dem direktionalen Transport dienen oder eine Funktion in nur einem der beiden Kompartimente ausüben (Floch et al., 2014a; Kohler und Hurt, 2007; Wente und Rout, 2010). Nucleoporine sind keine festen stationären Strukturen, sondern durchaus mobil und können sich von einem Ende zum anderen im NPC bewegen (Beck et al., 2004; Paulillo et al., 2005; Schwartz, 2005). Neben der Funktion beim Transport von Molekülen hat der NPC auch Funktionen bei der Organisation von Chromatin und bei der Generegulation und trägt zur genomischen Stabilität bei (Strambio-De-Castilla et al., 2010). So reguliert Nup179 unter anderem die Trennung von Chromosomen und die Integrität des Kinetochors (Kerscher et al., 2001).

### 3.2 Transport durch den NPC

Kleine Moleküle ( $\leq 30\text{-}40$  kDa) können den NPC durch Diffusion passieren. Größere Moleküle, wie Proteine oder RNAs, passieren den NPC selektiv, häufig vermittelt durch Transportproteine, die mit dem NPC interagieren. Beim selektiven Zugang solcher Transporter-Cargo-Komplexe zum NPC spielen vor allem die FG-Nucleoporine eine entscheidende Rolle (Stewart, 2007a; Wente und Rout, 2010).

Für die Mehrzahl der durch den NPC zu transportierenden Moleküle wird der Transport durch Transportproteine der sog. Karyopherin-Familie (Kap) vermittelt. Je nachdem ob sie ihr Kargo in den Kern importieren oder exportieren, werden sie Importine oder Exportine genannt. Karyopherine erkennen bestimmte Sequenzen in den von ihnen zu transportierenden Kargos. Diese Sequenzen bezeichnet man NES- („nuclear-export-signal“) für Proteinen bzw. Makromoleküle, die aus dem Zellkern exportiert werden und NLS („nuclear localization signal“) für Proteine, die in den Kern transportiert werden sollen (Fried und Kutay, 2003; Pemberton und Paschal, 2005) (Abb. 2A und 2B). Untersuchungen an dem Protein Nucleoplasmin ließen als erstes vermuten, dass solche Signale existieren. Dabei wurden Nucleoplasmin oder Nicht-Kern-Protein beschichtete Goldpartikel in das Zytoplasma von *Xenopus*-Oozyten injiziert und die



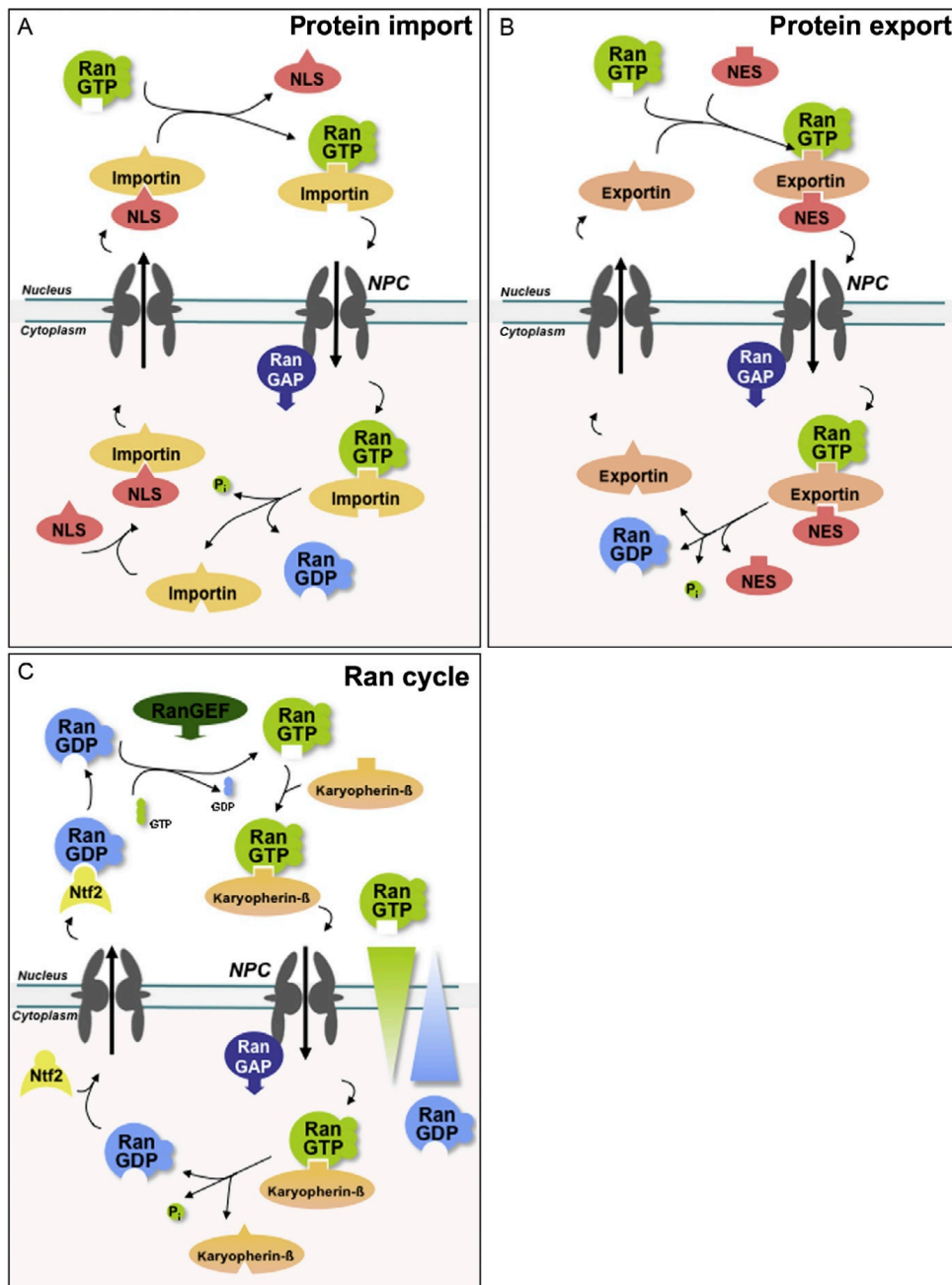


Abb. 2. Schematische Darstellung des Karyopherin-vermittelten Kerntransportes (A und B) und dessen Regulation durch die GTPase Ran (C) (aus Floch et al., 2014b). (s.a. Text)

Lokalisation beobachtet (Dworetzky et al., 1988). Die erste Sequenz dieser Art, ein NLS, wurde bei Untersuchungen des SV40-Virus entdeckt (Kalderon et al., 1984). Das am besten charakterisierte NLS ist das hydrophobe bzw. leucinreiche, klassische NLS. Nucleoplasmin oder das große T-Antigen des SV40 Virus haben solche klassischen NLS-Signale. Proteine mit klassischen NLS-Signalen werden dabei typischerweise von dem Karyopherin Importin  $\beta$  (Kap95 in *S. cerevisiae*) importiert, das diese über das

Adapterprotein Importin  $\alpha$  (Kap60/Srp1 in *S. cerevisiae*) bindet (Enenkel et al., 1995; Fried und Kutay, 2003; Gorlich und Kutay, 1999; Stewart, 2007a).

Die GTPase Ran bestimmt die Direktionalität des nukleozytoplasmatischen Transportes (Abb. 2C). Wie bei anderen GTPasen wird die Funktion von Ran im Wesentlichen durch Konformationsänderungen bestimmt, die sich dadurch ergeben, ob GTP oder GDP gebunden ist (Moore und Blobel, 1993; Stewart, 2007a). RanGTP liegt in höherer Konzentration im Zellkern vor. Dort kann es zusammen mit dem entsprechenden Exportin und dem zu transportierenden Molekül einen Komplex bilden, der dann durch den NPC transportiert wird. Im Zytoplasma trifft dieser RanGTP/Karyopherin-Komplex auf Ran-bindende Proteine (RanBP1 bzw. Yrb1 in *S. cerevisiae* oder RanBP2), die an den zytoplasmatischen Filamenten des NPCs lokalisiert sind (Bischoff et al., 1995; Yokoyama et al., 1995). Diese Proteine binden an den RanGTP/Karyopherin-Komplex, destabilisieren ihn und machen ihn dadurch zugänglich für ein weiteres wichtiges Protein in diesem Zusammenhang: Das Ran-GTPase-aktivierende Protein (RanGAP, Rna1 in *S. cerevisiae*), das ebenfalls im Zytoplasma lokalisiert ist. Dieses katalysiert die Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP, so dass sich der ursprüngliche Exportkomplex auflöst. RanGDP wird zusammen mit dem Transportprotein NTF2 („nuclear transport factor“), das spezifisch nur RanGDP bindet, zurück in den Zellkern transportiert (Ribbeck et al., 1998). Dort sorgt der Ran-Nucleotid-Ausstauschfaktor RanGEF („guanine nucleotide-exchange factor“) (RCC1, Prp20 in *S. cerevisiae*) dafür, dass RanGDP gegen RanGTP ausgetauscht wird. Dieses Protein ist nur im Zellkern lokalisiert (Bischoff und Ponstingl, 1991, Abb. 2C). Durch die asymmetrische Verteilung der Regulatoren RanGAP (Zytoplasma) und RanGEF (Zellkern) wird der RanGTP-Gradient über den Zellkernmembran gesichert und damit auch die Direktionalität der Transportprozesse (Nachury und Weis, 1999). Im Gegensatz zu Importinen, die eine hohe Affinität zu RanGDP haben und bei denen Bindung von RanGTP zu einer Dissoziation mit ihrem Kargo führt, weisen Exportine diese hohe Affinität nur auf, wenn sie zusammen mit einem Kargo einen Komplex bilden können. Ohne Kargo ist die Affinität zu Ran relativ gering. Die Hydrolyse von Nukleotidtriphosphaten stellt die Energie für die Aufrechterhaltung dieses Gradienten dar (Fried und Kutay, 2003; Gorlich und Kutay, 1999; Macara, 2001; Weis, 2003).

Neben dieser im Transport von Molekülen verankerten Funktion ist Ran auch an anderen wesentlichen Prozessen in der Zelle beteiligt. So spielt Ran z.B. eine Rolle

bei der Ausbreitung der Mitosespindel oder bei den Vorgängen an der Zellkernmembran während der Mitose (Koffa et al., 2006; Ribbeck et al., 2006).

Neben der aminoterminalen Bindestelle für RanGTP, bestehen die Karyopherine aus Wiederholungen von HEAT-Domänen („Huntington, elongation factor 3, PR65/A subunit of protein phosphatase 2A, TOR lipid kinase“) (Andrade und Bork, 1995). In Importin  $\beta$  bilden 19 dieser HEAT-Domänen eine gebogene, superhelixartige Struktur (Cingolani et al., 1999). Dieser molekulare Aufbau verleiht den Karyopherinen eine hohe Flexibilität, die für die Bindung von verschiedenen zu transportierenden Proteinen wichtig ist (Conti et al., 2006). Importin  $\beta$  (Kap95 in *S. cerevisiae*) transportiert in der Regel Proteine mit einem klassischen, hydrophoben NES, benötigt dafür allerdings das Adaptorprotein Importin  $\alpha$  (Kap60 / Srp1 in *S. cerevisiae*). Über eine aminoterminal Importin  $\beta$  Domäne bindet Importin  $\alpha$  die NES-haltige Protein an Importin  $\beta$  (Gorlich et al., 1996; Stewart, 2007a). Ein weiteres Adapterprotein ist Snurportin, mit dessen Hilfe Importin  $\beta$  Uracil-reiche, kleine nukleäre RNAs („uracil-rich, small nuclear RNA“, UsnRNA) in den Kern re-importiert (Huber et al., 1998). Nicht immer ist jedoch ein Adapterprotein notwendig: An ausgedehnte basische Sequenzen von einigen Proteinen (ribosomale Proteine, die Proteine Tat und Rev des Humanen Immunodefizient Virus, HIV) kann Importin  $\beta$  direkt binden (Jakel und Gorlich, 1998; Truant und Cullen, 1999). Auch PTHrP („Parathyroid hormone-related protein“) kann Importin  $\beta$  direkt binden (Cingolani et al., 2002). Schließlich formt Importin  $\beta$  auch Komplexe mit anderen Importinen. Das Importin  $\beta$  / Importin7 Heterodimer importiert das Histon H1 und ebenfalls einige ribosomale Proteine (Jakel et al., 1999).

Transportin ist ebenfalls ein Importprotein aus der Gruppe der Karyopherine. Es ist vor allem für den Import des mRNA-bindenden Proteins hnRNP A1 („heterogenous nuclear RNP“) und anderer mRNA-bindenden Proteinen verantwortlich. Dabei erkennt Transportin eine Glycin- und Asparaginreiche Signalsequenz, die als M9 bezeichnet wird (Nakielnny et al., 1996; Siomi et al., 1997). Das zu Transportin homologe Protein Kap104 in *S. cerevisiae* ist ebenfalls am nukleären Import von mRNA-bindenden Proteinen beteiligt. Kap104 ist für den Import der mRNA-bindenden Proteine Nab2 („nuclear abundant poly(A) RNA- binding protein“) und Nab4 / Hrp1 („hnRNP-like protein“) zurück in den Zellkern notwendig (Aitchison et al., 1996).

Als drittes Beispiel für importierende Karyopherine sind Transportin-SR und Transportin-SR2 zu nennen. Sie sind die Importrezeptoren für SR-(serin- und argininreiche)-Proteine bzw. phosphorylierte SR-Proteine. SR-Proteine stellen

essentielle Faktoren des prä-mRNA-Spleißens und des mRNA-Metabolismus in Metazoenzellen dar (Howard und Sanford, 2015; Sahebi et al., 2016). Dem homologen Protein in *S. cerevisiae*, Mtr10, konnte nachgewiesen werden, dass es analog zu Transportin-SR, die RS-Domänen der pendelnden SR-Proteins Npl3, Gbp2 und Hrb1 als Kernlokalisierungssignal erkennt und für den Import dieser mRNA-bindenden Proteins zurück in den Kern verantwortlich ist (Senger et al., 1998; Windgassen und Krebber, 2003; Hacker und Krebber, 2004)

Das Exportin CRM1 (Crm1, Kap124, Xpo1 in *S. cerevisiae*) ist ein essentieller Faktor für den Export von Proteinen unterschiedlicher Klasse (Ossareh-Nazari et al., 1997; Stade et al., 1997), darunter Zellzyklusregulatoren, Transkriptionsfaktoren, mRNA-bindende Proteine und verschiedene Klassen von RNA wie UsnRNA, ribosomale RNA und bestimmte mRNP-Komplexe (Fornerod und Ohno, 2002; Fried und Kutay, 2003; Popa et al., 2002). Meistens enthalten die Kargos als Kernexportsignal eine kurze, leucinreiche Sequenz. Ähnlich wie Importin  $\beta$  bindet auch CRM1 bzw. Xpo1 in *S. cerevisiae* seine Kargos entweder mittels Adapter oder direkt. Die 60S ribosomale Untereinheit z.B. verwendet den Adapter NMD3 (Nmd3 in *S. cerevisiae*) und bindet nicht direkt an CRM1 (Gadal et al., 2001; Ho et al., 2000).

Exportin t (Los1, Kap127 in *S. cerevisiae*) ist hauptsächlich am Export von tRNAs beteiligt (Fried und Kutay, 2003). Für Exportin t sind zwei Bindedomänen beschrieben, die sowohl auf der zytoplasmatischen als auch auf der nukleären Seite mit den Nukleoporinen des NPCs interagieren (Kuersten et al., 2002). Dies und die Tatsache, dass Exportin unter allen RNA-Exportern das einzige Protein ist, das direkt mit RNA interagieren kann (Hellmuth et al., 1998; Kutay et al., 1998), werden als Grund dafür vermutet, dass tRNAs schneller als andere RNA-Typen exportiert werden können (Fried und Kutay, 2003).

Das Exportin Cas, Cse1 in *S. cerevisiae* ist für den Re-Import von  $\alpha$ -Importinen in den Kern zuständig (Kohler et al., 1999; Kutay et al., 1997).

Der Transport von mRNAs wird durch die Nicht-Karyopherin Transportrezeptoren TAP/NXF1 bzw. Mex67 in *S. cerevisiae* vermittelt. Sie bilden Heterodimere mit p15/NXT1 bzw. Mtr2 in *S. cerevisiae* (Fahrenkrog und Aebi, 2003; Fried und Kutay, 2003; Pemberton und Paschal, 2005; Wentz und Rout, 2010).

### 3.3 mRNA-Export

Im Gegensatz zu Proteinen und anderen RNAs benötigt der Transport der meisten mRNAs weder das Protein Ran noch scheinen Transportrezeptoren aus der großen Gruppe der Karyopherine eine wesentliche Rolle zu spielen. Dennoch sind die Grundschr tte ähnlich zu den vorher beschriebenen: So bindet ein Exportrezeptor über Adaptoren die mRNA und erleichtert somit den Durchgang durch den NPC durch Bindung an FG-Nukleoporine (Pemberton und Paschal, 2005; Stewart, 2007b). Das humane Protein TAP und Mex67 aus *S. cerevisiae* konnten als Exportrezeptoren identifiziert werden. Sie gehören zur Gruppe der NFX-Familie. Erste Hinweise darauf, dass Mex67 ein möglicher Exportrezeptor sein könnte, gab die Beobachtung, dass Zellen, denen dieses Protein fehlte, sehr schnell poly(A)<sup>+</sup>-RNA im Kern akkumulierten (Segref et al., 1997). Mex67 bildet mit dem Adapterprotein Mtr2 ein Heterodimer, das wiederum die Bindung an FG-haltigen Nukleoporine induziert und für den Export von poly(A)<sup>+</sup>-RNA benötigt wird (Santos-Rosa et al., 1998). Das humane Homolog TAP oder auch NXF1 wurden im Zusammenhang unvollständig gespleißter mRNA des Manson-Pfizer-Monkey-Virus als möglicher Exportrezeptor identifiziert (Gruter et al., 1998; Pasquinelli et al., 1997). NXT1/p15 ist das Adapterprotein für TAP. Es hat keine große Sequenzähnlichkeit mit Mtr2, weist jedoch funktionell große Ähnlichkeit auf. Wie in *S. cerevisiae* wird durch die Heterodimerbildung die Nukleoporinbindungverst rkt. Diese ist für den mRNA-Export unerlässlich (Herold et al., 2001; Pasquinelli et al., 1997; Wiegand et al., 2002).

Der mRNA-Exportfaktor (Tap-p15 bzw Mex67-Mtr2 in *S. cerevisiae*) hat geringe Affinität zur mRNA und benötigt daher für den effizienten Export verschiedene andere mRNA-bindende Proteine als Adaptor bzw. Exportfaktoren (Santos-Rosa et al., 1998). Zu diesen Faktoren gehören u.a. Yra1, Nab2, der THO/TREX-Komplex, der TREX2-Komplex und die SR-Protein Npl3, Gbp2 und Hrb1.

Von der Transkription der prä-mRNA im Zellkern bis zum Export der reifen mRNA ins Zytoplasma, wo die Translation stattfindet, unterliegt die mRNA verschiedenen Reifungsprozessen (u.a. Kappenbindung am 5'-Ende, Spleißen, Polyadenylierung am 3'-Ende). Viele verschiedene Proteine binden während dieser Prozesse zu unterschiedlichen Zeitpunkten an die mRNA. Sie formen den „messenger“-Ribonukleoproteinkomplex (mRNP). Einige dieser Proteine binden schon in sehr frühen Stadien, das heißt ko-transkriptionell, andere erst später. Manche dieser Proteine lösen sich von dem mRNP schon im Kern, andere begleiten ihn durch den NPC. Von diesen

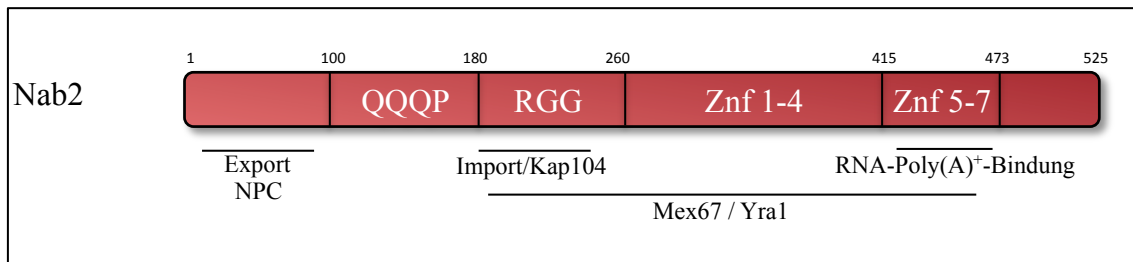
Proteinen wird angenommen, dass sie möglicherweise eine Funktion beim Export der mRNA ausüben. In *S. cerevisiae* sind gegenwärtig mehrere, zwischen Zellkern und Zytoplasma pendelnde Proteine bekannt. Zu dieser Gruppe gehört unter anderem der Exportrezeptor Mex67-Mtr2 (Santos-Rosa et al., 1998), die Kappenproteine Cbp80 und Cbp20 (Shen et al., 2000), das poly(A)-Bindeprotein Pab1 (Minvielle-Sebastia et al., 1997), Hrp1 (Kessler et al., 1997), Nab2 (Lee und Aitchison, 1999a) und die SR-ähnlichen Proteine Npl3 (Lee et al., 1996), Gbp2 (Windgassen und Krebber, 2003) und Hrb1 (Hacker und Krebber, 2004).

Die Export-Proteine Sub2 (RNA-abhängige ATPase) und Yra1 aus *S. cerevisiae* werden mit Hilfe des THO-Komplex (Tho2, Hpr1, Mft1, Thp2) während der Transkription an mRNA gebunden. Der THO-Komplex, der bei der Transkriptionselongation mitwirkt, bindet an DNA und wandert mit der RNA Polymerase II. Hpr1, als Mitglied des THO-Komplexes, interagiert direkt mit Sub2 und wird für das Beladen der mRNA mit Sub2 und Yra1 benötigt (Strasser und Hurt, 2001; Zenklusen et al., 2002). Yra1 ist ein Mitglied der REF („RNA und Exportfaktor bindende Proteine“-Familie und einer der ersten beschriebenen Adaptoren für Mex67 (Strasser und Hurt, 2000). Da dieser Komplex, bestehend aus THO-Komplex und den Exportfaktoren Sub2 und Yra1, die Transkription mit dem Export von mRNA verbindet, wird er auch TREX (Transkription/Export)-Komplex genannt. Er ist konserviert und konnte auch in Vertebraten gefunden werden. Die entsprechend homologen Proteine sind UAP56 (Sub2) und Aly/REF (Yra1). Interessanterweise ist der humane TREX-Komplex vor allem mit dem Spleißvorgang assoziiert (Masuda et al., 2005). Aly/REF, UAP56 und TAP-p15 können mit dem „Exon-Junction“-Komplex assoziieren, der an jeder Exon-Exon-Bindung in gespleißter mRNA zu finden ist (Le Hir et al., 2001). Arbeiten der Reed Arbeitsgruppe zeigten, dass der humane TREX-Komplex vor allem an das 5'-Ende der mRNA gebunden wird und dass für die Bindung des humanen TREX-Komplexes das kappenbindende Protein CBP80 benötigt wird (Cheng et al., 2006). Neben diesem Mechanismus kann der humane TREX-Komplex auch unabhängig vom Spleißapparat an die gerade entstehende mRNA gebunden werden. Hierbei dient das Protein Iws1 als eine Brücke zwischen dem Elongationsfaktor SPT6 und der TREX-Protein Aly/REF (Yoh et al., 2007).

Neben dem TREX-Komplex wurde in *S. cerevisiae* ein weiterer Komplex charakterisiert, der die Verknüpfung von Transkription und mRNA verstärkt. Dieser Komplex wird TREX-2-Komplex genannt (Iglesias und Stutz, 2008; Kohler und Hurt,

2007). TREX-2 besteht aus den Proteinen Sac3, Thp1, Sus1 und Cdc31. Sac3 wurde als zusätzlicher Exportfaktor identifiziert und ist in der Lage Mex67-Mtr2 zu rekrutieren und bindet an Thp1 (Fischer et al., 2002). Thp1 hat eine Funktion bei der Elongation während der Transkription (Gallardo und Aguilera, 2001). Beide Proteine interagieren mit dem Centrin Cdc31, einem Protein, das bei der Duplikation des Mikrotubuli-organisierenden Zentrums mitwirkt (Fischer et al., 2004; Gallardo et al., 2003) und Sus1, einem kleinem Protein, das als Komponente des bei der Initiation der Transkription beteiligten SAGA-Komplexes identifiziert wurde (Rodriguez-Navarro et al., 2004). TREX-2 ist nicht nur in der Lage Mex67-Mtr2 zu rekrutieren und damit den Kontakt der exportierenden mRNA zum Kernkomplex herzustellen, er ist selbst an die Innenseite des NPCs über Interaktion mit den Nukleoporinen Nup1 und Nup60 gebunden (Fischer et al., 2002). Es wird daher angenommen, dass dieser TREX-2-Komplex die SAGA-abhängige Genexpression mit dem mRNA-Export verknüpft und gleichzeitig daran beteiligt ist, den mRNP am NPC zu verankern (Rodriguez-Navarro et al., 2004). Dieses Modell wird durch die Tatsache unterstützt, dass sowohl der SAGA-Komplex als auch der TREX-2 Komplex für das Positionieren vom Genloci vom Kerninneren zur Kernperipherie benötigt werden (Akhtar und Gasser, 2007).

Nach der Transkription unterliegt die mRNA mehreren Prozessierungsschritten. Dazu gehören die Bildung einer Kappen-Struktur am 5'-Ende, die Spaltung und Polyadenylierung des 3'-Endes sowie das Spleißen zum Entfernen der Introns. Die 5'-Kappe wird bereits kurz nach Initiation der RNA-Polymerase II angehängt. Dieser Vorgang beginnt mit dem Anfügen von 7-Methylguanosin, das von dem CBC-Komplex („cap-binding-complex“) erkannt wird, der aus den Proteinen Cbp20 und Cbp80 besteht (Shuman, 2001). Die Kappe stabilisiert die mRNA und unterstützt die weiteren Prozessierungsschritte (Lewis und Izaurralde, 1997). Der Umstand, dass mRNAs, die nicht der regulären 3'-Prozessierung unterlaufen, nicht effizient ins Zytoplasma transportiert werden (Eckner et al., 1991; Huang und Carmichael, 1996) und, dass verschiedene Hefemutanten, die defekte 3'-Prozessierungsfaktoren produzieren, mRNA-Export-Defekte aufweisen (Hammell et al., 2002; Hilleren und Parker, 2001), lässt den Schluss zu, dass diese Prozesse ebenso wie die Transkription und mRNA-Export miteinander verknüpft sind (Cullen, 2003). Das poly(A)<sup>+</sup>-bindende-Protein Pab1 aus *S. cerevisiae* (PABPII in Mammalia), das die Länge des poly(A)<sup>+</sup>-Schwanzes reguliert, enthält ein leucinreiches NES und pendelt zwischen Zytoplasma und Zellkern hin und her. Pab1 rekrutiert den Nuklease-Komplex PAN zur mRNA. Ein Deletion von



**Abb. 3. Schematische Darstellung von Nab2.** NPC=Kernporenkomplex, QQQP=glutaminreiche Domäne, Znf=Zinkfingerdomäne.

*PAB1* führt zu einer Retention von mRNA im Zellkern (Dunn et al., 2005).

Auch Nab2 („nuclear polyadenylated RNA-binding protein“) interagiert mit poly(A)<sup>+</sup>-RNA und ist ebenso wie Pab1 für die Länge des poly(A)<sup>+</sup>-Schwanzes verantwortlich (Hector et al., 2002). Nab2 ist ein evolutionär hoch konservierter, essentieller, pendelnder Exportfaktor, der eine Komplexbindung mit Yra1 und Mex67 eingeht (Iglesias et al., 2010). Diese Funktion ist von einer Argininmethylierung durch Hmt1 abhängig (Green et al., 2002a). Nab2 besteht aus vier verschiedenen Domänen (Abb.3): einer N-terminale Domäne, einer glutaminreiche Domäne (QQQP), einer RGG(Arginin-Glycin-Glycin)-Domäne und einer Zink-Finger-Domäne (CCCH, Znf) (Anderson et al., 1993). Die RGG-Domäne, die Stelle der Methylierung durch Hmt1 („hnRNP methyltransferase“) und beinhaltet gleichzeitig das NLS und die Bindestelle für das Importin Kap104 (Green et al., 2002a; Lee und Aitchison, 1999a). Sowohl die RGG- als auch die Zinkfinger-Domäne sind für die korrekte Interaktion mit Mex67 und Yra1 notwendig. Die Zinkfingerdomäne ist auch in die Kontrolle der Länge des poly(A)-Schwanzes involviert (Iglesias et al., 2010; Kelly et al., 2007). Die N-terminale Domäne wird für den effizienten Export von Nab2 und poly(A)-RNA benötigt. Außerdem vermittelt diese Domäne die Interaktion mit Mlp1 („mysin-like-protein“), einem NPC-assoziierten Protein (Grant et al., 2008; Suntharalingam et al., 2004).

Die Formation von exportreifen mRNPs unterliegt einer Reihe von Kontrollmechanismen. Wesentlich ist hier das nukleäre Exosom, ein evolutionär stark konservierter Proteinkomplex, der unter anderem aus den 3'-5' Exoribonukleasen Dis3 und Rps6 besteht, involviert (Chlebowski et al., 2013). Die Bindung von Nab2 an mRNA ist abhängig von Rps6, was vermuten lässt, dass Nab2 und das Exosom zusammen agieren. In der Tat konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass Nab2 mRNA vor einem frühen Abbau im Kern schützen kann (Schmid et al., 2015; Schmid et al., 2012). Der TRAMP-Komplex bestehend aus Trf4, Air und Mtr4 kennzeichnet mRNAs für den Abbau durch das Exosom durch Anhängen von kurzen oligo(A)-Ende



(Anderson und Wang, 2009; Houseley und Tollervey, 2009). Der THO-Komplex verhindert, dass nicht korrekt verpackte mRNA mit der DNA hybridisiert und sogenannte R-Loops bildet (Huertas und Aguilera, 2003; Dominguez-Sanchez et al., 2011). Zusammen mit Sub2 ist er auch an der Translokation des mRNPs zum NPC vor dem Loslösen von korrekten mRNAs von der Transkriptionstelle beteiligt. (Rougemaille et al., 2008; Meinel und Strasser, 2015). Vor dem Entlassen der mRNA in das Zytoplasma stellt das sogenannte "nuclear basket" die vorerst letzte Kontrolle da. Die myosin-ähnlichen ("mynosin-like") Proteine, Mlp1 und Mlp2 vermitteln nicht nur das Zurückhalten malformierter und ungespleißter mRNA sondern auch ein Remodelling der mRNPs vor dem Durchtritt durch den Kernporenkomplex (Galy et al., 2004; Vinciguerra et al., 2005). Dazu gehört z.B die, durch die Ubiquitinierung der E3 Ligase Tom1 vermittelte Dissoziation von Yra1, das im Kern verbleibt und Mex67-Nap2 vermittelt (Iglesias et al., 2010).

Auf der zytoplasmatischen Seite spielt die stark konservierte Helikase Dbp5 ("DEAD-box protein", auch Rat8) eine zentrale Rolle beim Austritt der mRNPs aus dem Zellkern. Das essentielle Protein Dbp5 („DEAD box protein“) wird bereits während der Transkription auf die prä-mRNA transferiert und bindet an Komponente des Transkriptionsfaktors IIH (Estruch und Cole, 2003). Auf zytoplasmatischer Seite interagiert Dbp5 mit Nup159 am NPC (Hodge et al., 1999; Weirich et al. 2004). Die ansonsten sehr niedrige intrinsische ATPase-Aktivität wird durch Kofaktoren Gle1, das auch an der zytoplasmatischen Seite des NPCs lokalisiert ist und Inositolhexalphosphat (IP<sub>6</sub>) erhöht (Alcazar-Roman et al., 2006; Weirich et al., 2006). Die Hydrolyse von Adenosintriphosphat führt zu Konformationsänderungen der mRNPs und zum Loslösen von Gle1-IP<sub>6</sub>. Diese Konformationsänderungen bewirken unter anderem die Dissoziation des Exporters Mex67 und des Exportadaptors Nab2 (Lund und Guthrie, 2005; Tran et al., 2007). Man stellt sich vor, dass die Aktivierung der Helikase auf zytoplasmatischer Seite so möglicherweise das Zurückgleiten der mRNA in den Zellkern verhindert und dem mRNA-Export damit eine gewisse Direktionalität zuweist. Dbp5 konnte zusätzlich auch eine Rolle in der Termination der Translation nachgewiesen werden (Gross et al., 2007). Die durch die Helikaseaktivität hervorgerufene Konformationsänderung erlaubt so eine regelhafte Positionierung des Terminationsfaktors eRF1 und damit eine effiziente Termination der Translation. (Tieg und Krebber, 2013).

### 3.4 SR-Proteine

Humane SR-Proteine sind initial als essentielle Faktoren beim Spleißvorgang identifiziert worden. Mittlerweile sind diverse Funktionen beim gesamten mRNA Metabolismus bekannt, hier unter anderem beim Export, bei der Stabilisierung und bei der Translation. Sie sind hochkonservierte Proteine und neben einem oder zwei RNA-Erkennungs-Motiven („RNA recognition motive“, RRM), weisen sie eine in der Länge variable, Serin-Arginin-(SR)-reiche Domäne, derer sie ihren Namen verdanken (Howard und Sanford, 2015; Huang und Steitz, 2005; Sahebi et al., 2016).

Einige SR-Proteine (z.B. SRFS1, SRFS3, SRFS7 und SRFS10) pendeln zwischen Zellkern und Zytoplasma und können den Exportfaktor TAP/p15 rekrutieren und diesen direkt über die SR-Domäne binden (Huang et al., 2003; Zhong et al., 2009, Howard und Sanford, 2015). Diese Interaktion wird vom Phosphorylierungsstatus der Serinreste in der RS-Domäne reguliert: im hyperphosphorylierten Zustand werden sie zum Spleißvorgang rekrutiert und im Anschluß daran hypophosphoryliert. Die Affinität von TAP zu SRFS1 (SF2/ASF) und SRFS7 (9G8) ist höher, wenn diese hypophosphoryliert sind (Huang et al., 2003; Huang et al., 2004a). Im Zytoplasma regulieren Kinasen der SR-Protein-Kinase-Familie (SRPK1 und SRPK2) (Gui et al., 1994; Wang et al., 1998) und der Clk/Sty-Familie die Re-phosphorylierung der Serinreste (Colwill et al., 1996). 1999 wurde mit Sky1 („SR kinase in yeast“) eine zu SRPK-Familie homologe Kinase in *S. cerevisiae* identifiziert (Siebel et al., 1999). Unter den möglichen Substraten fand man Npl3, ein mit den humanen SR-Proteinen verwandtes Protein. Npl3 ist ein essentielles Protein, dass vor allem in der Rolle des pendelnden Exportfaktors gut untersucht ist. Bei *npl3*-Mutanten mit Veränderungen im RRM-Bereich konnte beobachtet werden, dass poly(A)<sup>+</sup>-RNA im Zellkern akkumuliert (Lee et al., 1996). Außerdem dissoziiert Npl3 unter Stressbedingungen von der mRNA und ein Großteil

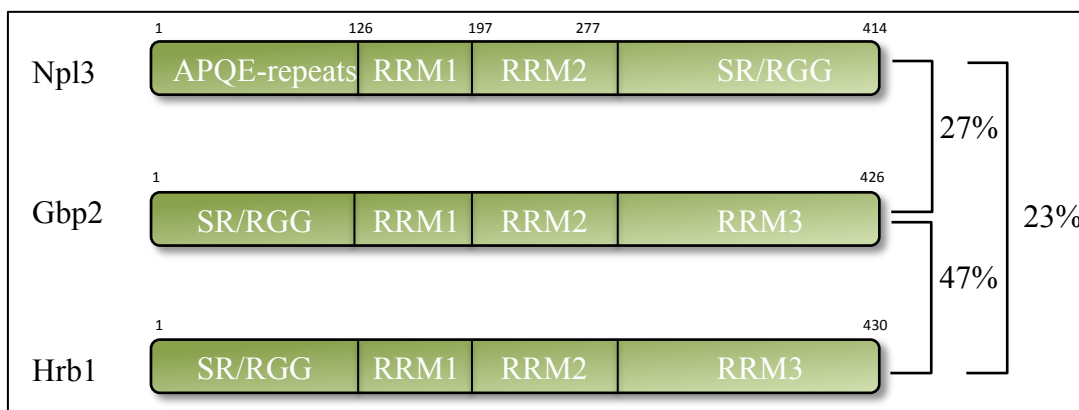


Abb. 4. Schematische Darstellung von SR-Proteine in *S. cerevisiae*. RRM=„RNA recognition motif.“

des mRNA-Exportes ist dadurch geblockt (Krebber et al., 1999).

Npl3 besitzt zwei RMMs und carboxyterminal eine Arginin-Glycin reiche Domäne, in der acht RS/SR-Dipeptide liegen (SR/RGG-Domäne) (Abb. 4). Wie bei humanen SR-Proteinen ist auch bei Npl3 der Phosphorylierungsstatus wichtig für seine Funktion. Das anfängliche Modell sah sowohl die Phosphorylierung durch Sky1 als auch die Bindung an Mtr10 in die Dissoziation von Npl3 von mRNA involviert sind (Gilbert et al., 2001; Yun und Fu, 2000). Dies beruhte auf den Beobachtungen, dass Npl3 in einem *sky1*-Deletionsstamm im Vergleich zur Lokalisation in einem Wildtypstamm vermehrt im Zytoplasma lokalisiert ist und die Bindung von Mtr10 zu Npl3 vermindert ist (Gilbert et al., 2001; Yun und Fu, 2000). Des Weiteren bindet nicht-phosphoryliertes Npl3 in einem *mtr10*-Deletionstamm stärker an mRNA (Gilbert et al., 2001). Dichtegradientenuntersuchungen konnten aber zeigen, dass Mtr10 und nicht Sky1 für die Dissoziation von Npl3 mit der mRNA verantwortlich ist (Windgassen et al., 2004). Die Phosphorylierung durch Sky1 verhindert am ehesten eine unspezifische Bindung von Npl3 an mRNA im Zytoplasma und induziert die Dissoziation von Mex67 und Npl3, wodurch der Mtr10-Npl3-Komplex stabilisiert wird (Izaurrealde, 2004; Windgassen et al., 2004). Da defektes Npl3 (*npl3-27*) zu einem Translationsdefekt führt, wurde Npl3 als negative Regulator der Translation beschrieben (Windgassen et al., 2004). Kürzlich konnte aber gezeigt werden, dass Npl3 neben mRNA auch in den Export der großen ribosomalen Untereinheit involviert ist (Hackmann et al., 2011) und dass Npl3 für die korrekte Formation der Monosomen und damit bei der Initiierung der Translation benötigt wird (Baierlein et al., 2013). Phosphorylierung durch Sky1 ist bei der Rolle von Npl3 bei der Translation nicht wesentlich (Baierlein et al., 2013). Damit ist Npl3 in wichtige Schritte der Genexpression auf beiden Seiten der Kernmembran involviert. Auch humane SR-Proteine wurden in Polysomen nachgewiesen, ihnen wird aber eher eine Funktion als Verstärker der Translation zugesagt (Michlewski et al., 2008).

Für die Dissoziation des Npl3-Mtr10 Komplexes im Zellkern wird RanGTP und das Vorhandensein von RNA benötigt. Npl3 interagiert mit der Polymerase II und Polymerase II-Aktivität ist ausreichend, um Npl3 ko-transkriptionell zur mRNA zu rekrutieren (Lei et al., 2001; Lei und Silver, 2002). Die nukleäre Phosphatase Glc7 dephosphoryliert dann Npl3, was mit dem Loslösen der 3'Formationsmaschinerie koinzidiert und dies führt zu einer direkten Interaktion von Npl3 mit Mex67 (Gilbert und Guthrie, 2004). Diese De-Phosphorylierung wird für einen effizienten mRNA-

Export benötigt (Gilbert und Guthrie, 2004). Neben der Phosphorylierung ist auch die Methylierung von Argininresten der RGG-Domäne durch die nukleäre Methyltransferase Hmt1 für effizienten mRNA-Export notwendig. Sie steigert die Exportrate von Npl3 erheblich (Shen et al., 1998). Des Weiteren schwächt die Methylierung von Npl3 dessen Interaktion mit anderen nukleären Proteinen wie z.B. Tho2. Dadurch wird möglicherweise der Export von Npl3 gebundenen mRNAs unterstützt (McBride et al., 2005).

Neben Npl3 wurden in dieser Gruppe zwei weitere SR-Proteine, Gbp2 und Hrb1, identifiziert (Hacker und Krebber, 2004; Windgassen und Krebber, 2003). Die Proteine weisen große Homologien untereinander auf, wobei Gbp2 und Hrb1 die größte Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz zueinander haben (Abb. 4). Hrb1 und Gbp2 sind ebenfalls zwischen Zytoplasma und Zellkern pendelnde, mRNA-bindende Proteine, deren Export von kontinuierlicher mRNA-Transkription und vom Vorhandensein des Exportfaktors Mex67 abhängt (Hacker und Krebber, 2004; Windgassen und Krebber, 2003). Im Vergleich zu anderen, pendelnden mRNA-bindenden Proteinen wie Nab2, Hrp1 und Pab1 sind die drei SR-Proteine noch während der Elongation des Translationsprozesse an mRNA im Zytoplasma gebunden (Windgassen et al., 2004). Der Importrezeptor für Gbp2 und Hrb1 ist ebenfalls Mtr10, das Protein fördert auch die von Dissoziation beider Proteine von der mRNA (Hacker und Krebber, 2004; Windgassen und Krebber, 2003). Leichte Unterschiede gibt es bei der Funktion der Phosphorylierung durch Sky1, der einzigen SRPK in *S. cerevisiae*. Eine Deletion von *sky1* führt in ähnlicher Weise zu einer verstärkten Assoziation von Npl3 mit mRNA wie eine *mtr10*-Deletion. Die verstärkte Assoziation von Gbp2 zu mRNA ist bei *sky1*-Deletion im Vergleich zur *mtr10*-Deletion jedoch deutlich geringer ausgeprägt (Windgassen und Krebber, 2003). Andererseits ist Gbp2 in einem *sky1*-Deletionstamm zu 100% zytoplasmatisch lokalisiert, während sich für Npl3 und Hrb1 nur eine leichte Veränderung von einer nukleären zu einer zytoplasmatischen Lokalisation zeigte (Gilbert et al., 2001; Hacker und Krebber, 2004). Sky1 phosphoryliert Npl3 am Serinrest 411 (S411) (Yun und Fu, 2000), für Gbp2 konnte gezeigt werden, dass Sky1 die Serinreste S13, S15 und S17 in einen in vitro Kinase Assay phosphoryliert (Lukasiewicz et al., 2007), in vivo scheint allerdings nur die Phosphorylierung an S15 und S17 wichtig für den Import von Gbp2 zu sind (Windgassen und Krebber, 2003). Die genaue Sequenz an der Sky1 Hrb1 phosphoryliert konnte bisher nicht identifiziert

werden. Mittels Austauschmutanten von Hrb1 konnte gezeigt werden, dass S46 hierfür am ehesten nicht in Frage kommt (Häcker, 2003).

Gbp2 und Hrb1 konnten als wichtige Kontrollfaktoren beim Spleißen identifiziert werden. Gbp2 und Hrb1 rekrutieren bei fehlerhaft gespleißte mRNAs den TRAMP-Komplex und diese mRNAs werden durch das nukleäre Exosom abgebaut. Bei korrekter mRNA binden Gbp2 und Hrb1 den Exportrezeptor Mex67 und präparieren sie so für den Export durch den NPC (Hackmann, et al. 2014).

Während Npl3 mit dem gesamten zu transkribierenden Gen, inklusive der Promotorregion assoziiert und bereits früh an die mRNA über Interaktion mit RNA-polymerase II rekrutiert wird (Lei et al., 2001), sind Hrb1 und Gbp2 nicht in der Promoterregion zu finden (Hacker und Krebber, 2004). Gbp2 und Hrb1 werden erst später über den TREX-Komplex zur mRNA rekrutiert. Sie benötigen die THO-Komponenten Hrp1 und Mft1 für effizienten Export (Hacker und Krebber, 2004; Hurt et al., 2004; Martinez-Lumbreras et al., 2016). Für Npl3, dass ja sehr früh an die RNA bindet, konnte kürzlich nachgewiesen, dass ein Fehlen auch zu Änderung der Genexpression führt (Holmes et al., 2015).

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <b>Mikroskope:</b>    | Leitz Aristoplan Fluoreszenz-Mikroskop (Leitz, Wetzlar) mit Digitalkamera Orca C4742-95 (Hamamatsu Photonics, Herrsching) und Computerprogramm HPD-CP Version 2.6.2.0 (Hamamatsu Photonics, Herrsching)<br>Nikon Eclipse E400 mit Mikromanipulator (Nikon, Düsseldorf)<br>Leitz Biomed Typ 020-507.010 (Leitz, Wetzlar)   |
| <b>Inkubatoren:</b>   |   |
| - Bakterien:          | Schüttelinkubator AJ112 (Infors, Bottmingen/Schweiz)<br>Brutschrank B6120 (Heraeus, Hanau)  |
| - Hefe:               | Schüttelinkubator Innova 4230 (New Brunswick Scientific, Edison/USA)<br>Brutschrank BK-600 (Heraeus, Hanau)   |
| <b>Elektrophorese</b> |   |
| - Agarosegele:        | Wide Mini Sub Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA)   |
| - SDS-PAGE:           | Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA)<br>Modell V15.17 Gel Elektrophorese System (Biometra biomedizinische Analytik, Göttingen)  |
| <b>Zentrifugen:</b>   | Tischzentrifugen Biofuge Pico und Biofuge Fresco für 1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäß (Heraeus, Hanau)<br>Kühlzentrifuge Multifuge 3L-R für PP-Röhrchen (Heraeus, Hanau)<br>Kühlzentrifuge J2-21 M/E mit Rotor JS-13.1 (Beckman Instruments, Fullerton/USA)<br>Kühlzentrifuge J-6 M/E mit Rotor JA-10 (Beckman Instruments, Fullerton/USA)<br>Ultrazentrifuge L8-60M mit Rotor SW40 (Beckman Instruments, Fullerton/USA)<br>Vakuumbzentrifuge SpeedVac SC100 (Savant Instruments, New York/USA) mit Gefriertrocknungsanlage Leybold-Heraeus Lyovac GT2 (Heraeus, Hanau) und Drehschieber-Vakuumpumpe Typ RZ8 (Vacuubrand, Wertheim)   |
| <b>Netzgeräte:</b>    | Model 200/2.0 Power Supply (Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA)<br>Model 100/200 Power Supply (Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA)<br>LKB-ECPS 3000/150 (Amersham Biosciences Europe, Buckinghamshire/England)  |
| <b>Sonstige:</b>      | PCR-Gerät Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research, Waltham/USA)<br>Photometer Spectra Max 340 (MWG-Biotech, Ebersberg) mit Computerprogramm Softmax Pro Version 1.2.0 (Molecular Devices, Ismaning/München) und Ultrospec 3000 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire/England)<br>UV-Transilluminator (IVP, San Gabriel/USA) mit Videokamera, Monitor und Videoprinter P68E (Mitsubishi, Japan)<br>Culture Tube Rotator SC1 (Stuart Scientific, Redhill/England)<br>Hämazytometer Neubauer improved (Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen)<br>Wasserbäder SW-21C, beheizbar (Julabo, Seelbach) und Haake L, beheizbar (Thermo Haake, Karlsruhe)<br>Autoklav Bioclav (Schütt, Olching)<br>pH-Meter 764 Multi-Calimatic (Knick, Egelsbach)<br>Milli-Q Water Purification System (Millipore, Eschborn)<br>Waage Sartorius Laboratory (Sartorius, Göttingen) und Feinwaage Sartorius Research R200D (Sartorius, Göttingen)<br>Heizblöcke Dri-Block DB-3 (Techne, Duxford Cambridge/England) und TM 130-6 mit Schüttelfunktion (HLC)<br>Magnetrührer Ikamag Ret (IKA-Labortechnik, Staufen)<br>Vortex VF2 und Ika-Vibrax-VXR (IKA-Labortechnik, Staufen)<br>Stickstofftank Chronos Biosafe (Messer-Griesheim, Düsseldorf)<br>Mikrowelle Micromat (EHG Elektroholding, Frankfurt am Main)<br>Objekträger (Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen) |

## 4.2 Chemikalien

|   |   |
|---|---|
| Acrylamid                                 | Carl Roth (Karlsruhe)                   |
| Agar                                      | Invitrogen (Karlsruhe)                  |
| Agarose                                   | Carl Roth (Karlsruhe)                   |
| Ampicillin                                | Serva (Heidelberg)                      |
| Bacto yeast nitrogen base w/o amino acids | Becton Dickinson (Franklin Lake s/ USA) |
| BSA                                       | New England Biolabs (Frankfurt)         |
| Comassie brilliant blue R-250             | Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)      |
| DAPI                                      | Carl Roth (Karlsruhe)                   |
| DNA-Molekulargewichtsstandard:            |   |
| Lambda DNA 0,5 mg/ml EcoRI+HindIII        | MBI Fermentas (St.Leon-Rot)             |
| pUC19/MspI(HpaII)                         | MBI Fermentas (st.Leon-Rot)             |
| dNTPs                                     | Peqlab (Erlangen)                       |
| Ethidiumbromid                            | Carl Roth (Karlsruhe)                   |
| 5-Fluororotsäure                          | Apollo Scientific Limited (England)     |
| Hefeextrakt                               | Invitrogen (Karlsruhe)                  |
| Heringssperma Träger-DNA                  | Clontech (Palo Alto / USA)              |
| IPTG                                      | Gerbu (Gaiberg)                         |
| Kanamycin                                 | Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)      |
| N-Propyl-Gallat                           | Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)      |
| PEG                                       | Merck (Darmstadt)                       |
| Polylysin                                 | Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)      |
| Polyvinylpyrrolidon                       | Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)      |
| Proteaseinhibitor-Mischung                | Boehringer (Mannheim)                   |
| Protein-Molekulargewichtsstandard:        |   |
| benchmark protein ladder                  | Invitrogen (Karlsruhe)                  |
| benchmark prestained protein ladder       | Invitrogen (Karlsruhe)                  |
| Temed                                     | Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)      |
| Triethanolamin                            | Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)      |
| tRNA                                      | Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)      |
| Tryptone                                  | Invitrogen (Karlsruhe)                  |
| Tween20                                   | Merck (Darmstadt)                       |
| X-Gal                                     | Gerbu (Gaiberg)                         |
| Yeast sythetic dropout medium supplement  | Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)      |

Alle übrigen Chemikalien wurden im höchsten Reinheitsgrad von folgenden Firmen bezogen: Boehringer Mannheim (Mannheim), Difco (Detroit,USA), Invitrogen (Karlsruhe), Gerbu Biotechnik (Gaiberg), Merck (Darmstadt), Messer Griesheim (Düsseldorf), Amersham Pharmacia (Freiburg), Roche Diagnostics (Mannheim), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen).

### 4.3 Stämme

#### 4.3.1 *Escherichia coli*-Stämme

**Tab. 1. Genotypen des verwendeten Bakterienstammes.** Die Bezeichnung des Genotyps entspricht der allgemeinen Nomenklatur für *E. coli* (Bachmann, 1983).

| <i>E. coli</i> -Stamm     | Genotyp  | Referenz / Quelle            |
|---------------------------|--|------------------------------|
| <b>TOP10F<sup>-</sup></b> | F' {lacI <sup>q</sup> Tn10 (Tet <sup>R</sup> )} <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> )<br>ΦlacZΔM15 ΔlacX74 <i>recA1 deoR araD139</i> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i>  | Invitrogen, Karlsruhe        |
| <b>JM109</b>              | <i>recA1 endA1 gyr96A thi hsdR17 supE44 relA1</i> lambda <sup>-</sup><br>Δ( <i>lac-proAB</i> ) (F' <i>traD36 proAB laqI<sup>q</sup>ZAM15</i> )   | Prof.R.Lill, Marburg         |
| <b>M 15 [pREP4]</b>       | <i>RecA<sup>+</sup> nal<sup>S</sup> str<sup>S</sup> rif<sup>S</sup> lac<sup>-</sup> Ara<sup>-</sup> gal<sup>-</sup> Mtl<sup>-</sup> F<sup>-</sup> Uvr<sup>+</sup> lon<sup>+</sup></i><br>[F2 <i>lac<sup>2</sup> ara<sup>2</sup> mtl<sup>2</sup> Km<sup>R</sup></i> ] | Qiagen, Hilden               |
| <b>BL21 (DE3)</b>         | F <sup>-</sup> <i>dmc ompT hsdS</i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) <i>galλ</i> (DE3)   | Prof. H. Bastians, Göttingen |

#### 4.3.2 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

**Tab. 2. Genotypen der verwendeten Hefestämme.** Die Bezeichnungen der Genotypen entsprechen der allgemeinen Nomenklatur für *S. cerevisiae* (Sherman, 1981).

| <i>S. cerevisiae</i> -Stamm | Genotyp   | Referenz/Quelle             |
|-----------------------------|---|-----------------------------|
| HKY35                       | <b>Wildtyp</b><br><i>Mata ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63</i>  | Winston et al., 1995        |
| HKY36                       | <b>Wildtyp</b><br><i>Mata ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200</i>   | Winston et al., 1995        |
| HKY77                       | <b><i>rpb1-1</i></b><br><i>Mata ura leu trp his</i>   | R.A. Young, Cambridge / USA |
| HKY124                      | <b><i>rat7-1</i></b><br><i>Mata ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200</i>   | C. N. Cole, Hanover / USA   |
| HKY 258                     | <b><i>tom1::HIS3</i></b><br><i>Mata ade2-101 his3Δ200 leu2Δ1 lys2-801 trp1Δ63 ura3-52</i>                   | Duncan et al., 2000         |
| HKY267                      | <b><i>sky1::TRP1</i></b><br><i>Mata ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 ade3</i>                    | Siebel et al., 1999         |
| HKY315                      | <b><i>mex67::HIS3</i></b><br><i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 ade2</i><br>+ <i>pmex67-5-ProtA LEU2 CEN4 ARS1</i> | Segref et al., 1997         |
| HKY319                      | <b><i>rpb1-1</i></b><br><i>Mata ura leu his</i>   | Prof. H. Krebber, Göttingen |



|        |   |                                |
|--------|---|--------------------------------|
| HKY335 | <i>spt6</i><br><i>Mata ura leu</i>  | Prof. H. Krebber,<br>Göttingen |
| HKY353 | <i>nab2::LEU2</i><br><i>MATα his trp leu ura</i><br>+ <i>pnab2-21 TRP CEN</i>                       | Hector et al.,<br>2002         |
| HKY356 | <i>taf1-N568Δ</i><br><i>Mata ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 Δtaf145</i><br>+ <i>pTM43/taf146(T567K)</i> | Tsukiyesi et al.,<br>2000      |

#### 4.4 Plasmide

Tab. 3. Auflistung der verwendeten Vektoren und rekombinanten Plasmide.

| Plasmide  | Charakterisierung  | Referenz/Quelle                 |
|---|--|---------------------------------|
| Genomische<br>Plasmidbibliothek<br>von <i>S. cerevisiae</i> | <i>URA3 CEN4 ARS1 Amp<sup>r</sup></i>  | Rose et al., 1987               |
| pCR <sup>®</sup> II-Topo                                    | <i>Amp<sup>r</sup> Km<sup>r</sup></i>  | Invitrogen,<br>Karlsruhe        |
| pHK116<br>(pOE 60)  | <i>P<sub>T5</sub>: 6*HIS</i><br><i>Amp<sup>r</sup></i>                         | Quiagen,<br>Hilden              |
| pHK 172<br>(pET 15b)  | <i>P<sub>T7</sub>: 6*HIS</i><br><i>Amp<sup>r</sup></i>                         | Prof. R.Lill,<br>Marburg        |
| pHK186  | <i>KAP104</i><br><i>TRP1 2μ</i>  | Prof. H.Krebber,<br>Göttingen   |
| pHK195  | <i>P<sub>npl3</sub>: NPL3</i><br><i>URA3 2μ</i>                                | Lee et al., 1996                |
| pHK225  | <i>HRB1</i><br><i>URA3 CEN6 ARS H4</i>   | Prof. H.Krebber,<br>Göttingen   |
| pHK235  | <i>P<sub>GAL1</sub>:HRB1-GFP</i><br><i>URA3 2μ Amp<sup>r</sup></i>             | Shen et al., 1998               |
| pHK367  | <i>P<sub>GBP2</sub>:GBP2-GFP</i><br><i>URA3 CEN6 ARS4 Amp<sup>r</sup></i>      | Windgassen und<br>Krebber, 2003 |
| pHK419  | <i>GFP-npl3(RA8)</i><br><i>CEN LEU2 Amp<sup>r</sup></i>                        | Gilbert et al.,<br>2001         |
| pHK431  | <i>P<sub>GBP2</sub>:GBP2-S15A-GFP</i><br><i>URA3 CEN6 ARS4 Amp<sup>r</sup></i> | Windgassen und<br>Krebber, 2003 |

|        |   |                                   |
|--------|---|-----------------------------------|
| pHK506 | <b>P<sub>T5</sub>:GBP2-6*HIS</b><br>Amp <sup>r</sup>  | Prof. H.Krebber,<br>Göttingen     |
| pHK521 | <b>P<sub>HRB1</sub>: hrb1(S46A)-GFP</b><br>URA3 CEN6 ARS4 Amp <sup>r</sup>                                    | Prof. H.<br>Krebber,<br>Göttingen |
| pHK522 | <b>pCR<sup>®</sup>-II-Topo<sup>®</sup> + HRB1</b><br>Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>                         | diese Arbeit                      |
| pHK524 | <b>pCR<sup>®</sup>-II-Topo<sup>®</sup> + gbp2(S15/17E)-N-Terminus</b><br>Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>     | diese Arbeit                      |
| pHK525 | <b>P<sub>GBP2</sub>:GBP2-S15717E-GFP</b><br>URA3 CEN6 ARS4 Amp <sup>r</sup>                                   | diese Arbeit                      |
| pHK542 | <b>pCR<sup>®</sup>-II-Topo<sup>®</sup> + hrb1(S46A)</b><br>Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>                   | diese Arbeit                      |
| pHK544 | <b>pCR<sup>®</sup>-II-Topo<sup>®</sup> + nab2(249-525)</b><br>Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>                | Prof. H.<br>Krebber,<br>Göttingen |
| pHK558 | <b>pCR<sup>®</sup>-II-Topo<sup>®</sup> + P<sub>NAB2</sub>:nab2(1-200)</b><br>Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> | Prof. H.<br>Krebber,<br>Göttingen |
| pHK560 | <b>P<sub>T5</sub>:HRB1-6*HIS</b><br>Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>  | diese Arbeit                      |
| pHK561 | <b>P<sub>T5</sub>:hrb1(S46)-6*HIS</b><br>Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>                                     | diese Arbeit                      |
| pHK562 | <b>P<sub>NAB2</sub>:nab2(1-200)-P<sub>GBP2</sub>:GBP2-nab2(249-525)</b><br>URA3 CEN6 ARS4 Amp <sup>r</sup>    | diese Arbeit                      |
| pHK582 | <b>P<sub>T7</sub>:hrb1(S46A)-6*HIS</b><br>Amp <sup>r</sup>  | diese Arbeit                      |
| pHK584 | <b>P<sub>NAB2</sub>:nab2(Δ201-248)</b><br>URA3 CEN6 ARS4 Amp <sup>r</sup>                                     | diese Arbeit                      |
| pHK580 | <b>MTR4 YJL049w YJL048c</b><br>URA3 CEN4 ARS1 Amp <sup>r</sup>  | Rose et al., 1987                 |
| pHK585 | <b>mtr4(Δ1-3304) YJL049w YJL048c</b><br>URA3 CEN4 ARS1 Amp <sup>r</sup>                                       | diese Arbeit                      |

|        |   |                    |
|--------|---|--------------------|
| pHK586 | <b><i>PRP8</i></b><br><i>URA3 CEN4 ARS1 Amp<sup>r</sup></i>   | Rose et al., 1987  |
| pHK587 | <b><i>YEPlac195 + COS8</i></b><br><i>URA3 2<math>\mu</math> Amp<sup>r</sup></i>                         | Spode et al., 2002 |
| pHK588 | <b><i>pCR<sup>®</sup>-II-Topo<sup>®</sup> + HRB1-5*HIS</i></b><br><i>Amp<sup>r</sup> Km<sup>r</sup></i> | diese Arbeit       |
| pHK591 | <b><i>P<sub>T7</sub>:HRB1-5*HIS</i></b><br><i>Amp<sup>r</sup></i>                                       | diese Arbeit       |

## 4.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide dienen als Startermoleküle für Polymerasekettenreaktionen (2.10.6) und wurden für Sequenzierungen (2.10.13) verwandt. Alle aufgeführten Oligonukleotide wurden HPLC-gereinigt von der Firma MWG-Biotech bezogen.

**Tab. 4. Auflistung der verwendeten Oligonukleotide.** Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen und Mutations-einführende Sequenzen fettgedruckt dargestellt.

\* Diese Oligonukleotide stammen von der Firma Invitrogen, Karlsruhe.

| Bezeichnung          | Nukleotidsequenz          | Länge (nt) |
|----------------------|---------------------------|------------|
| <b>M13 Forward*</b>  | 5'- GTAAAACGACGGCCAG - 3' | 16         |
| <b>M13 Reverse *</b> | 5'- CAGGAAACAGCTATGAC -3' | 17         |
| <b>HK84</b>          | 5'- TCCTGCTCGCTTCGC -3'   | 15         |
| <b>HK85</b>          | 5'- GATATAGGCGCCAGC -3'   | 15         |
| <b>HK91</b>          | 5'- GCAATGGTGGTTAAC-3'    | 15         |
| <b>HK96</b>          | 5'-TGATGCAGATGTTTG -3'    | 15         |
| <b>HK99</b>          | 5'- TTTCGAGCTTCTTCG -3'   | 15         |
| <b>HK100</b>         | 5'-GGTGCCCTCTTGATG -3'    | 15         |

|              |  |    |
|--------------|--|----|
| <b>HK131</b> | <i>ClaI</i><br>5' - CCATCGATAGCTCTAATCATTTTCATC<br>CTC -3'                                   | 29 |
| <b>HK143</b> | <i>EcoRI</i><br>5' - GGAATTCGGTAGGCGTAAGTTCGC<br>-3'   | 25 |
| <b>HK254</b> | <i>EcoRI</i><br>5'-GGAATTCATGGAGAGAGAGCTAGGGA<br>TGTATGGAAATGATAGGAGTAGAGAAAGAG<br>AACCTG-3' | 64 |
| <b>HK255</b> | <i>NcoI</i><br>5'-CCATGGGGATGAGTGATGATCATGG-3'   | 25 |
| <b>HK256</b> | <i>BamHI</i><br>5'-GGATCCGAGGCGTTTAGCGTACG -3'   | 23 |
| <b>HK279</b> | <i>BamHI</i><br>5'-GGATCCGTAGTAGTAGTAGTGGA<br>GGCGTTTAGCGTACGATA-3'                          | 44 |

## 4.6 Enzyme

### Enzym

Alkalische Phosphatase (CIAP)

RNase A

T4 DNA-Ligase

*Taq*-Polymerase

*Pfu*-Polymerase

*Pwo*-Polymerase

TripleMaster-Polymerase Mix

Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I

Zymolase 20T

### Bezugsquelle

Invitrogen (Karlsruhe)

Quiagen (Hilden)

Roche (Mannheim), Boeringher (Mannheim))

Invitrogen (Karlsruhe), Amersham Pharmacia

Biotech (Freiburg)

Stratagene (La Jolla, USA)

Peqlab (Erlangen)

Eppendorf (Hamburg)

New England biolabs (Frankfurt)

Seiagaku (Tokyo, Japan)

Die Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), New England biolabs (Frankfurt/Main) und RocheDiagnostics (Mannheim) bezogen.

## 4.7 Reaktions- und Nachweissysteme

| System                                | Bezugsquelle            |
|---------------------------------------|-------------------------|
| TripleMaster PCR System               | Eppendorf (Hamburg)     |
| Concert Rapid Gel extraction system   | Concert (Karlsruhe)     |
| NucleoSpin Extract 2 in 1             | Macherey-Nagel (Düren)  |
| Ax 100 Nukleobond® Cartridge Midi Kit | Machery-Nagel (Düren)   |
| QIAquick PCR-Purification Kit         | Qiagen (Hilden)         |
| TOPO TA cloning® Kit                  | Invitrogen (Eggenstein) |
| Ni-NTA Spin Kit                       | Quiagen (Hilden)        |

## 4.8 Computerprogramme und Datenbanken

DNA- und Proteinsequenzen wurden den Internet-Datenbanken „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und „Saccharomyces Genome Database“ (SGD) (<http://www.yeastgenome.org>) entnommen und mit dem Lasergene-Programmpaket der Firma DNASTAR 4.2, Madison/USA analysiert.

## 4.9 Kultivierung von Bakterien und Hefen

Zur Herstellung von Festmedien wurde dem entsprechendem Flüssigmedium für *E. coli* 1.5 % bzw für *S. cerevisiae* 1,8% (w/v) Agar zugesetzt. Die Nährmedien wurden autoklaviert und hitzelabile Komponenten wie Antibiotika wurden vor ihrer Verwendung sterilfiltriert (Bottle Top-Filter, 0,2 µm Porengröße (Nunc, Wiesbaden) oder Einmalfilter FP030/3, 0,2 µm Porengröße (Schleicher & Schuell, Dassel) und dem autoklavierten Medium zugesetzt.

### 4.9.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

**LB-Medium (pH 7,5)** (Sambrook et al., 1989)

|             |             |
|-------------|-------------|
| 1 % (w/v)   | Pepton      |
| 0,5 % (w/v) | Hefeextrakt |
| 1 % (w/v)   | NaCl        |

**SOB-Medium** (Inoue et al., 1990)

|             |             |
|-------------|-------------|
| 2 % (w/v)   | Pepton      |
| 0,5 % (w/v) | Hefeextrakt |

|       |                   |
|-------|-------------------|
| 10 mM | NaCl              |
| 10 mM | MgSO <sub>4</sub> |
| 10 mM | MgCl <sub>2</sub> |

Das SOB-Medium wurde steril-filtriert.

Zur Selektion von plasmidkodierten Resistenzen wurden die Medien durch Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml bzw. Kanamycin 25 µg/ml ergänzt. Übernachtkulturen wurden mindestens 16 h in einem Schüttelinkubator bei 180 UpM bebrütet. Zelldichten wurden durch Trübungsmessung in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen das entsprechende Medium als Referenz ermittelt. Eine OD<sub>600</sub> von 1 entspricht hierbei etwa  $2 \times 10^8$  *E. coli*-Zellen/ml.

#### 4.9.2 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

**YPD-Medium** (Rose et al., 1987)

|           |             |
|-----------|-------------|
| 1 % (w/v) | Hefeextrakt |
| 2 % (w/v) | Pepton      |
| 2 % (w/v) | Glukose     |

**Nährstoff-Mangelmedien** (Rose et al., 1987)

|             |   |
|-------------|---|
| 0,7 % (w/v) | “Bacto yeast nitrogen base w/o amino acids” |
| 0,2 % (w/v) | “Yeast synthetic dropout medium supplement” |
| 2 % (w/v)   | Glukose                                     |

Zur Selektion eines plasmidlokalisierten Markergens, das eine Stoffwechselauxotrophie des Hefestammes komplementierte, wurde das Nährstoff-Mangelmedium so gewählt, dass es das Produkt des jeweiligen Stoffwechselweges nicht enthielt.

**„Super“-SPO-Medium** (Rose et al., 1987)

|                  |                         |
|------------------|-------------------------|
| <u>Lösung 1:</u> | 0,5 % (w/v) Hefeextrakt |
|                  | 306 mM Kaliumacetat     |
| <u>Lösung 2:</u> | 5 mM Glukose            |
|                  | 0,4 mM Adenin           |
|                  | 0,7 mM Uracil           |
|                  | 0,4 mM Tyrosin          |
|                  | 0,2 mM Histidin         |

|        |              |
|--------|--------------|
| 0,3 mM | Leucin       |
| 0,2 mM | Lysin        |
| 0,2 mM | Tryptophan   |
| 0,3 mM | Methionin    |
| 0,2 mM | Arginin      |
| 1,2 mM | Phenylalanin |
| 5,9 mM | Threonin     |

Nach dem Autoklavieren von Lösung 1 und dem Steril-filtrieren von Lösung 2 wurden beide Lösungen im Verhältnis 1:1 zusammengegeben.

#### **B-Platten:**

|           |   |
|-----------|---|
| 0,7 %     | “Bacto yeast nitrogen base w/o amino acids” |
| 3 % (w/v) | Agar  |
| 2 % (w/v) | Glukose                                     |

#### **FOA-Platten (Rose et al., 1987):**

|             |  |
|-------------|--|
| 0,7 % (w/v) | “Bacto yeast nitrogen base w/o amino acids”                |
| 0,2 % (w/v) | “Yeast synthetic dropout medium supplement” ohne<br>Uracil |
| 0,45 mM     | Uracil   |
| 0,1 % (w/v) | 5-Fluoroorotsäure  |
| 2 % (w/v)   | Glukose  |
| 3 % (w/v)   | Agar   |

Das Medium wurde sterilfiltriert und dem Agar nach dem Autoklavieren zugesetzt.

FOA-Platten wurden zur Selektion uracil-auxotropher Zellen verwendet werden. 5-Fluoroorotsäure führte dazu, dass Produkt des Gens URA3 zu der toxischen Substanz 5-Fluorouracil metabolisiert (Boeke et al., 1987).

Die verwendeten Hefestämme wurden standardmäßig bei 25 °C kultiviert. Kulturvolumina bis zu 10 ml wurden in einem Brutroller, größere in Erlenmeyerkolben auf einem Schüttelinkubator bei 130 UpM bebrütet. Übernachtskulturen wurden für mindestens 16 h inkubiert. Für Gefrierkulturen wurden logarithmisch wachsende Zellen in 50 % (v/v) Glycerin resuspendiert und bei -80 °C gelagert. Zelldichten wurden durch Auszählen in einem Hämazytometer oder durch Trübungsmessung in einem Photometer

bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen das entsprechende Medium als Referenz ermittelt. Eine OD<sub>600</sub> von 1 entspricht hierbei einem Titer von ca.  $4 \times 10^7$  *S. cerevisiae*-Zellen/ml.

Zur Induktion des Glukose-reprimierbaren *GALI*-Promotors wurden die Zellen bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ( $1-3 \times 10^7$  Zellen/ml bzw. OD<sub>600</sub> = 0,5) in Nährstoff-Mangelmedium bebrütet, das 2 % (w/v) Raffinose anstelle von Glukose als Kohlenstoffquelle aufwies. Anschließend erfolgte die Induktion durch Zugabe von 2 % (w/v) Galaktose.

## 4.10 Methoden zur in vitro Rekombination von DNA

### 4.10.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

#### 4.10.1.1 Miniplasmid-Isolierung (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979)

|                                |             |          |
|--------------------------------|-------------|----------|
| <u>Sol 1-Lösung (pH (8,0):</u> | 25 mM       | Tris/HCl |
|                                | 50 mM       | Glucose  |
|                                | 10 mM       | EDTA     |
| <u>Sol 2-Lösung:</u>           | 1 % (w/v)   | SDS      |
|                                | 0,2 N       | NaOH     |
| <u>Sol 3-Lösung (pH: 5,2):</u> | 2,5 M       | KAac     |
|                                | 9,6 % (w/v) | Eisessig |

Miniplasmidisolationen wurden in der Regel für die Analyse von Bakterienklonen nach Transformationen (4.10.11) durchgeführt, um Klonierungen zu überprüfen. Dafür wurden am Vorabend 5 ml LB-Medium mit entsprechender Selektionslösung mit dem gewünschten *E.coli*-Stamm angeimpft. Diese Kultur wurde dann bei 37°C im Schüttelinkubator über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die *E. coli*-Übernachtskultur durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, 3.800 x g) und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde in 100 µl Sol1-Lösung resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden 200 µl Sol2-Lösung zugegeben und die beiden Phasen durch 4-5-maliges Invertieren gemischt. Anschließend wurde für 5 min bei RT inkubiert. Es folgte die Zugabe von 100 µl eiskalter Sol3-Lösung, eine erneute Durchmischung und eine Inkubation von 5 min auf Eis. Durch alkalische Lyse werden hierbei Proteine und genomische DNA gefällt. Zelltrümmer und das Präzipitat wurden durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, 16.100 x g). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden



400 µl Phenol-Chloroform-Isopropylalkohol zugefügt und die Mischung intensiv gevortext. Durch Zentrifugation (5 min, 16.100 x g) wurde die wässrige, Plasmid-DNA-enthaltende Oberphase separiert und überführt. Mittels Zugabe von 800 µl Ethanol abs. und anschließender Inkubation für 10 min auf Eis wurde die DNA schließlich gefällt. Hierbei entzieht Alkohol der DNA ihre Hydrathülle, sodass sie als Kaliumsalz ausfällt. Diese Plasmid-DNA wurde sedimentiert (5 min, 16.100 x g) und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, der Plasmid-DNA-Niederschlag bei Raumtemperatur luftgetrocknet und in 20 µl Wasser wieder aufgenommen. Bevor die Plasmid-DNA zur Verwahrung bei –20°C eingefroren wurde, wurde noch 1 µl RNase A (10mg/ml) hinzugefügt.

#### 4.10.1.2 Midi-Säulenpräparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA in größerer Menge und in höherem Reinheitsgrad wurde mit Hilfe des „Ax 100 Nukleobond® Cartridge Midi Kit“ (4.7) durchgeführt. Die Vorgehensweise orientierte sich am mitgelieferten Protokoll des Herstellers. Die so gewonnene Plasmid-DNA wurde unter anderem für Klonierungen (4.10.5 - 4.10.11) oder Sequenzierungen (4.10.12) verwendet.

#### 4.10.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA in wässriger Lösung wurde photometrisch gegen A. dest. als Referenz ermittelt. Eine OD<sub>260</sub> von 1,0 entspricht bei einer einigermaßen proteinfreien dsDNA-Lösung einer Konzentration 50 µg /ml. Unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors der zu messenden Lösung lässt sich so die Konzentration der Probe bestimmen. Das Verhältnis von OD<sub>260</sub> zu OD<sub>280</sub> sollte dabei ca. 1,7 betragen. Niedrigere Werte deuten auf Proteinverunreinigung hin.

Alternativ wurden unbekannte DNA-Mengen auch in Agarosegelen (4.10.3) mit Hilfe des Molekulargewichtsstandards abgeschätzt.

#### 4.10.3 Analyse von DNA durch Agarosegelelektrophorese (Sambrook et al., 1989)

|                       |             |                                       |
|-----------------------|-------------|---------------------------------------|
| <u>TAE-Puffer:</u>    | 40 mM       | Tris/HCl                              |
|                       | 0,1 % (v/v) | Essigsäure                            |
|                       | 1 mM        | EDTA                                  |
| <u>Gelladepuffer:</u> | 25 %        | Ficoll                                |
|                       | 0,25 %      | Xylencyanol FF (läuft bei ca. 700 bp) |

|        |                                       |
|--------|---------------------------------------|
| 0,25 % | Bromphenolblau (läuft bei ca. 600 bp) |
| 3 mM   | EDTA                                  |

Bei der elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel, wandert die negativ geladene DNA (Phosphatrückgrat) zur positiven Anode, so kommt es zu einer größenabhängigen Auftrennung von DNA-Fragmenten. Dabei wurden horizontale 1 – 2%ige TAE-Agarosegele verwendet. Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose im TAE-Puffer aufgekocht. Nach kurzem Abkühlen wurde dann 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben und die Agarose schließlich in die Form gegossen, damit sich bei weiterem Abkühlen ein Gel ausbilden konnte. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der DNA. Dabei verändert sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid so, dass unter UV-Licht die DNA mit dem eingelagert Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Die Lichtintensität ist dabei proportional zur vorliegenden DNA-Konzentration.

Als Laufpuffer während der Elektrophorese wurde 1 x TAE-Puffer verwendet. Die zu analysierenden Proben wurden mit 1/5 Volumen Gelladepuffer versetzt und bei 10 V/cm<sup>2</sup> aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde ein Größenmarker neben die Proben aufgetragen. Die Dauer der Elektrophorese variierte zwischen 20 min und 2h, abhängig davon, in welcher Größe die DNA aufgetrennt werden sollte. Das Ergebnis wurde mit UV-Licht visualisiert und über eine Videokamera mit angeschlossenem Drucker dokumentiert.

#### **4.10.4 DNA-Reinigung**

Mit diesem Verfahren wurde PCR-Produkte oder DNA-Moleküle aus anderen Reaktionsansätzen aus Agarosegelen gewonnen bzw. aufgereinigt. Nach der Elektrophorese wurde die DNA-Bande der gewünschten Laufhöhe unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem ausgeschnittenen Gelstück erfolgte mit Hilfe des „Concert™ Rapid Gel Extraction“-Kits entsprechend dem mitgelieferten Protokoll des Herstellers. Die Agarose wird in diesem System durch Natriumperchlorat aufgelöst und die DNA in einem Zentrifugationssäulchen an eine Silica-Membran gebunden. Die Elution der DNA in H<sub>2</sub>O erfolgte nicht immer, wie im Protokoll vorgeschlagen in 50 µl sondern oft in kleineren Volumina (> 20 µl). Auf diese Weise sollte eine höhere Konzentration der gewonnenen DNA-Lösung erreicht werden. Die Elution wurde mit 70°C warmen H<sub>2</sub>O durchgeführt.

#### 4.10.5 Polymerasekettenreaktion (modifiziert nach Saiki et al., 1988)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktionen („polymerase chain reaction“, PCR) wurden DNA-Sequenzen in vitro vervielfältigt. Als Startermoleküle dienten synthetisierte Oligonukleotide (4.5). Diese wurden auch dazu verwendete gezielte Mutationen („site directed mutagenesis“) oder Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen (4.10.7) einzuführen. Es kamen dabei verschiedene thermostabile, DNA-abhängige DNA-Polymerasen (4.6) zum Einsatz. Zumeist wurde zuerst die DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (Pfu-Polymerase) verwendet, da diese eine Korrekturlesefunktion („proofreading“-Aktivität) hat. Des Weiteren werden bei Verwendung der Pfu-Polymerase keine überhängenden Adenosylreste an das 5'-Ende angehängt. Vor allem aber wenn längere Oligonukleotide verwendet wurden war die Effizienz der PCR eingeschränkt. In diesen Fällen wurde die thermostabile, DNA-abhängige DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* verwendet, die keine Korrekturlesefunktion hat und an das 3'-Ende des synthetisierten Stranges einen 3' A-Überhang anknüpft.

Die Reaktionen wurden mit dem PTC-200 Peltier Thermocycler der Firma Messer Griesheim durchgeführt. Ein Reaktionsansatz hatte in der Regel ein Volumen von 100 µl oder 50 µl. Die Anzahl der durchgeführten Zyklen (Denaturierung, Hybridisierung, Elongation) betrug 35. Dem ersten PCR-Zyklus ging eine 5 minütige Denaturierungsphase bei 95 °C voraus, dem Letzten schloss sich eine Elongationsphase von 5 min bei 72 °C an.

##### Reaktionsansatz:

|        |  |
|--------|--|
| 1 µl   | genomische DNA (in 100 µl Reaktionsansatz) |
| 1 x    | PCR-Puffer                                 |
| 200 µM | pro dNTPs                                  |
| 3 µM   | Primer 1                                   |
| 3 µM   | Primer 2                                   |

Alternativ zur genomischen DNA wurden 10 ng von Plasmid-DNA als Matrize eingesetzt.

##### PCR-Zyklus:

|                |       |   |
|----------------|-------|---|
| Denaturierung  | 95 °C | 0,5 min                                   |
| Hybridisierung | 50 °C | 0,5 min                                   |
| Elongation     | 72 °C | ~ 1 min/1000 bp ( <i>Taq</i> -Polymerase) |
|                | 68 °C | ~ 2 min/1000 bp ( <i>Pfu</i> -Polymerase) |

In Abhängigkeit vom Ergebnis der PCR wurde die Hybridisierungstemperatur verändert: traten nebenbei unspezifischen PCR-Produkten auf, wurde sie erhöht. Wenn bei den Standardbedingungen kein PCR-Produkt nachweisbar war, wurde die Temperatur herabgesetzt.

#### **4.10.6 TOPO-TA-Klonierung**

Der bei der Topo-TA-Klonierung verwendete Vektor ist linearisiert und hat an seinem 3'-Ende überhängende Thymidinreste. Die *Taq*-Polymerase hat eine Matrizen unabhängige Transferaseaktivität, die Desoxyadenosinreste an das 3'-Ende des PCR-Produktes synthetisiert (4.10.5). Der Ablauf der PCR orientierte sich dabei streng am mitgelieferten Protokoll des Herstellers. Die Ligation und die Transformation (4.10.11) in *E. coli* schlossen sich möglichst unmittelbar an die PCR-Synthese des Insertionsfragmentes an, um einen Abbau des 3'Desoxyadenosins zu vermeiden und wurden ebenfalls laut Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

In Ausnahmen, z.B. wenn zwischen PCR und Ligation einige Stunden lagen, oder anstatt der *Taq*-Polymerase eine *Pfu*-Polymerase verwendet wurde, dann wurde das PCR-Produkt aus einem Agarosegel eluiert und bei 72 °C mit Zugabe von 8 mM dATPs sowie 1 x *Taq*-Puffer und 1U *Taq*-Polymerase für 15 min inkubiert. Unmittelbar daran erfolgten dann die weiteren Klonierungsschritte (Ligation und Transformation) laut Protokoll des Herstellers. Selektion des Plasmid erfolgte mit Ampicillin und Kanamycin.

Das TopoTA-Klonierungssystem bietet eine Blau-Weiß-Selektion: Das DNA-Fragment wird in das *lacZ*-Gen des Topovektor kloniert, sodass die  $\beta$ -Galaktosidase nicht mehr exprimiert werden kann. Den Agarplatten wird daher IPTG und X-Gal nach Angaben der Hersteller hinzugefügt. IPTG induziert den *lacZ*-Promoter und X-Gal ist das Substrat der  $\beta$ -Galaktosidase. War die Klonierung erfolgreich, sollte die gewachsene Kolonie eine weiße Farbe haben. Wenn keine DNA-Fragment vorhanden ist, kann die  $\beta$ -Galaktosidase X-GAL spalten und die Kolonien erscheinen in blauer Farbe.

#### **4.10.7 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen können gezielt Phosphodiesterbindungen der DNA hydrolysiert werden. Dabei wurden pro  $\mu$ g DNA 5-10 U der entsprechenden Endonuklease eingesetzt. Als Reaktionspuffer wurde der zugehörige, vom Hersteller empfohlene Reaktionspuffer verwendet. Die Reaktionsvolumina richteten sich nach der

eingesetzten DNA-Menge. Für analytische Zwecke wurde in der Regel ein Volumen von 20µl gewählt. Für die Inkubationstemperatur und –dauer wurden die Angaben des Herstellers beachtet.

#### **4.10.8 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden**

Um Re-Ligationen zu verhindern, wurde linearisierte Vektor-DNA vor dem Einsatz in eine Ligationreaktion (4.10.10) am 5'-Ende dephosphoryliert. Hierzu wurde der Restriktionsansatz (4.10.7) nach Beendigung der Restriktion mit 1 U alkalischer Phosphatase (CIAP) (4.6) versetzt und nach Angaben des Enzym-Herstellers inkubiert.

#### **4.10.9 Herstellen von stumpfen DNA-Enden**

Sollten für die Ligation (4.10.10) von Vektor und DNA-Fragment keine entsprechenden Restriktionsendonukleasen gefunden werden, konnte mit Hilfe des Klenow Fragmentes der DNA-Polymerase 1 von *E. coli* stumpfe Enden („blunt ends“) erzeugt werden. Dieses Fragment besitzt zwei Enzymfunktionen, nämlich die Polymerase-Funktion, bei der DNA-Bausteine verknüpft werden, und eine 3'-5'-Exonuklease-Funktion, bei der falsch eingebaute DNA-Bausteine von einem bestimmten DNA-Ende her wieder entfernt werden. Es kommt so zum Auffüllen von 5'-überstehenden, einzelsträngigen DNA-Sequenzen (Polymerasefunktion) und zum Abbau von 3'-überstehenden, einzelsträngigen DNA-Sequenzen (Exonukleasefunktion) nach Restriktionen.

Zur Durchführung wurde dem Restriktionsansatz nach der hydrolytischen Spaltung (4.10.7) 1U Klenow-Enzym und 0,5 mM pro dNTP zugegeben und dann für 15 min im Heizblock bei 30°C inkubiert. Durch die anschließende Aufreinigung über ein Agarosegel oder mittels PCR-Aufreinigungskit (4.7) wurde die Reaktion gestoppt.

#### **4.10.10 Ligation**

Zur Herstellung rekombinanter Plasmide wurden DNA-Fragmente durch das Enzym T4-DNA-Ligase (4.6) mit adäquat restringierter Vektor-DNA kovalent verbunden. Dabei bilden sich Phosphodiesterbindungen entweder zwischen kompatiblen kohäsiven („sticky ends“) oder zwischen stumpfen Enden („blunt ends“) aus. Meist wurden 100 ng restringierter Vektor eingesetzt. Nach dem Restriktionsverdau (4.10.7) mit den entsprechenden Enzymen war dieser zuvor gelelektrophoretisch von den exzisierten Fragmenten getrennt worden und anschließend aus dem Agarosegel aufgereinigt worden (4.10.3).

Das molare Verhältnis von Fragment zu Vektor im Ligationsgemisch war 2:1. Zur Berechnung der einzusetzenden Menge des restringierten Insertionsfragmentes wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{Menge des Vektors [ng]} \times \text{Kb-Größe des Fragments}}{\text{Kb Größe des Vektors}} \times \text{molares Verhältnis} \frac{\text{Fragment}}{\text{Vektor}} = \text{Fragmentmenge}$$

Aufgrund des Ergebnisses dieser Rechnung ergab sich folgender Reaktionsansatz:

Reaktionsansatz:

Ermittelte Menge an DNA-Fragment

100 ng Vektor

1 µl 10xPuffer für T4-Ligase

1 µl T4-Ligase (1 U/µl)

x µl H<sub>2</sub>O

→ 10 µl Gesamtvolumen

Neben diesem Ligationsansatz wurde ein Kontrollansatz ohne DNA-Fragment angefertigt. Die Inkubation des Reaktions- und des Kontrollansatzes erfolgte ÜN bei 16 °C im Wasserbad. Danach wurden kompetente *E. coli*-Bakterien mit beiden Ansätzen transformiert (4.10.11) und diese über Nacht bei 37 °C bebrütet. Die Zahl der gewachsenen Kolonien, in die der Kontrollansatz transformiert wurde, lieferte Informationen über das Maß der Religation des Vektors.

#### 4.10.11 Transformation

##### 4.10.11.1 Herstellung ultrakompetenter *Escherichia coli* (Inoue et al., 1990)

|                            |     |    |                   |
|----------------------------|-----|----|-------------------|
| <u>TB-Puffer (pH 7,0):</u> | 10  | mM | Pipes             |
|                            | 55  | mM | MnCl <sub>2</sub> |
|                            | 250 | mM | KCl               |
|                            | 15  | mM | CaCl <sub>2</sub> |

250 ml SOB-Medium wurden mit 10 ml einer *E. coli* - Übernachtskultur inokuliert und dann bei 25°C im Schüttelinkubator (4.1) bebrütet bis eine Dichte von OD<sub>600</sub> = 0,5 – 0,7 erreicht war. Die Kultur wurde dann auf 50 ml-Aliquots verteilt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (10 min, 3.800 x g, 4°C), das Pellet wurde in 80 ml TB resuspendiert und die Zellsuspension erneut 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 3.800 x g, 4°C)

wurde der Überstand verworfen und die Aufnahme des Zelniederschlags erfolgte in 20 ml eiskaltem TB mit 1,5 ml DMSO. Es folgte eine weitere Inkubation für 10 min auf Eis. Abschließend wurde die Zellsuspension zu 500 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bei – 80 °C gelagert.

#### **4.10.11.2 Transformation mit Plasmid-DNA**

Standardmäßig wurden 100 ng Plasmid-DNA (4.10.1) oder 10 µl eines Ligationsansatzes (4.10.10) zur Transformation eingesetzt. Zunächst wurden 100 µl transformationskompetente *E. coli* langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurde die Plasmid-DNA bzw. der Ligationsansatz der Zellsuspension zugefügt und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschocks des Transformationsansatzes (90 sec, 42 °C). Dabei sollte die Aufnahme der DNA in die Zelle erfolgen. Direkt im Anschluss wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und die Probe etwa 1 h – 2 h bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation (10-20 sec, 16.100 x g) sedimentiert, der Überstand vorsichtig mit Vakuumpumpe abgesaugt und der Niederschlag dann in etwa 50µl LB-Medium aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde auf selektivem LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Zumeist wurde dem Agar Ampicillin zugeben, das richtete sich allerdings nach der Resistenz, die das jeweilige Plasmid trug.

#### **4.10.12 DNA-Sequenzierung**

Sämtliche PCR-Produkte (4.10.5) wurden nach ihrer Klonierung sequenziert, um sie auf eventuelle unerwünschte Mutationen zu prüfen. Die Sequenzierungsarbeiten wurden von der Firma Seqlab in Göttingen durchgeführt, als Startermoleküle dienten synthetisierte Oligonukleotide (5.5).

#### **4.10.13 Konstruktion der verwendeten Plasmide**

Die Konstruktion der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide erfolgte in folgenden Einzelschritten:

##### **Klonierung von PCR-Produkten:**

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte entweder mittels TopoTA-System (4.10.6) oder wie folgt beschrieben: Nach der Polymerasekettenreaktion (4.10.5) wurde das amplifizierte DNA-Fragment säulenchromatographisch gereinigt (4.10.4) und in einer Restriktionsreaktion (4.10.7) eingesetzt. Auch das für die Klonierung vorgesehene Plasmid wurde entsprechend hydrolysiert. Im Anschluss daran wurden sowohl das

PCR-Produkt als auch der Vektor-Anteil des Plasmids nochmals über ein präparatives Agarosegel (4.10.3) gereinigt, eluiert (4.10.5) und daraufhin wie unter 4.10.10 beschrieben ligiert.

#### **in vitro-Rekombination von Plasmid-DNA**

Beide Plasmide wurden hydrolysiert (4.10.7), die interessierenden Fragmente mittels Agarose Gelelektrophorese (4.10.3) und Elution (4.10.4) isoliert und in einer Ligationsreaktion eingesetzt.

**pHK522:** PCR mit HK255/HK256, Matrize: pHK225, über TopoTA-Klonierungssystem in pCR<sup>®</sup>II-Topo;

Sequenziert mit den Oligonukleotiden vom Hersteller und HK143

⇒ Insertion von *HRB1*

**pHK524:** PCR mit HK254/HK131, Matrize: pHK367, über TopoTA-Klonierungssystem in pCR<sup>®</sup>II-Topo;

Sequenziert mit den Oligonukleotiden vom Hersteller

⇒ Insertion von *gbp2(S15/I7E)*

**pHK525:** *EcoRI/ClaI*-Fragment aus pHK524 in pHK367 kloniert;

Sequenziert mit HK91 (über eingefügte Mutation)

⇒ Austausch *GBP2* gegen *gbp2(S15/I7E)*

**pHK542:** PCR mit HK255/HK256, Matrize: pHK521; über TopoTA-Klonierungssystem in pCR<sup>®</sup>II-Topo;

Sequenziert mit den Oligonukleotiden vom Hersteller

⇒ Insertion von *hrb1(S46A)*

**pHK560:** *NcoI/BamHI*-Fragment aus pHK522 in pHK116 kloniert;

Sequenziert mit HK100

⇒ Insertion von *HRB1*, Veränderungen im Promotorbereich, keine Expression (s.a. Ergebnisse 5.4)

**pHK561:** *NcoI/BamHI*-Fragment aus pHK542 in pHK116 kloniert;

Sequenziert mit HK100

⇒ Insertion von *hrb1(S46A)*, Veränderungen im Promotorbereich, keine Expression (s.a. Ergebnisse 5.4)

**PHK562:** *NheI/XhoI*-Fragment aus pHK544 in pHK558

Insertion von *nab2(249-525)* (*NAB2*-C-Terminus)



**pHK582:** *NcoI/NheI*-Fragment aus pHK561 in pHK172 *NcoI/XhoI*; die nicht kompatiblen kohäsiven Enden der DNA wurden mittels Klenow-Fragment in glatte Enden umgewandelt (4.10.9) und konnten so ligiert werden (4.10.10)  
Sequenzierung mit HK96/100

⇒ Insertion von *hrb1(S46A)*

**pHK584:** *Sall/XhoI*-Fragment (8200 bp) aus pHK562 religiert:

Restriktionsanalyse mit *PstI/NheI*

⇒ Deletion von  $P_{gbp2}$ :*GBP2*

**pHK585:** pHK580 mit *HindIII* restringiert, Vektor (~11800bp) im Agarosegel isoliert, aufgereinigt und religiert;

Restriktionsanalyse mit *HindIII* und *BamHI*

⇒ Deletion von *mtr4Δ1-3304*, (83 Aminosäuren vom *MTR4*-C-Terminus verbleiben)(s. Ergebnisse 5.2.3.1)

**pHK588:** PCR mit HK255/HK279, Matrize: pHK225, über TopoTA-Klonierungssystem in pCR®II-Topo;

Sequenziert mit den Oligonukleotiden vom Hersteller (M13 forward und reverse) und HK99

⇒ Insertion von *HRB1*

**pHK591:** *NcoI/BamHI*-Fragment aus pHK588 in pHK172 kloniert;

Sequenzierung mit HK100;

⇒ Insertion von *HRB1*

## 4.11 Methoden mit *Saccharomyces cerevisiae*

### 4.11.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* (Rose et al., 1987)

|                                      |     |         |              |
|--------------------------------------|-----|---------|--------------|
| <u>Detergenz-Lyse-Puffer (pH 8):</u> | 2   | % (v/v) | Triton X-100 |
|                                      | 1   | % (v/v) | SDS          |
|                                      | 0,2 | M       | NaCl         |
|                                      | 1   | mM      | EDTA         |
|                                      | 10  | mM      | Tris-HCl     |

Die Hefezellen aus einer 5 ml ÜN-Kultur der stationären Phase wurden durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, 3.800 x g). Der Überstand wurde verworfen, der Niederschlag wurde in 300 µl Detergenz-Lyse-Puffer resuspendiert und in ein 1,5 ml-

Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 400 µl PCI und 300 µl Glasperlen zugegeben. Durch ein zweiminütiges Vortexen erfolgte das mechanische und chemische Aufschlagen der Zellen. Die freigesetzte Plasmid-DNA löst sich in der wässrigen oberen Phase, die Proteine u. a. in PCI. Durch Zentrifugation (2 min, 16.100 x g) lassen sich die beiden Phasen separieren. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1 ml Ethanol abs. erfolgte die Ausfällung der DNA. Diese wurde anschließend sedimentiert (2 min, 16.100 x g) und es folgte ein Waschschrift mit 70 %igem Ethanol. Schließlich wurde das Plasmid-DNA-Sediment bei RT luftgetrocknet und in 15 µl sterilem Wasser resuspendiert. In der Regel wurde der komplette Ansatz dann für eine Transformation in *E. coli* (4.10.11) verwendet, um danach über eine Midiplasmidisolation (4.10.1.2) das aus *S. cerevisiae* gewonnene Plasmid zu vervielfältigen und mit höherem Reinheitsgrad zu reinigen.

#### 4.11.2 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* mit Plasmid-DNA (Rose et al., 1987)

|                                       |     |         |               |
|---------------------------------------|-----|---------|---------------|
| <u>TE/Lithiumacetat (pH 7,5):</u>     | 100 | mM      | Lithiumacetat |
|                                       | 10  | mM      | Tris/HCl      |
|                                       | 1   | mM      | EDTA          |
| <u>PEG/TE/Lithiumacetat (pH 7,5):</u> | 40  | % (v/v) | PEG 4000      |
|                                       | 100 | mM      | Lithiumacetat |
|                                       | 10  | mM      | Tris/HCl      |
|                                       | 1   | mM      | EDTA          |

5 ml YPD-Medium wurden mit einer Einzelkolonie eines Hefestammes beimpft und bei 25°C bis zu einer Dichte  $1-3 \times 10^7$  Zellen/ml inkubiert. Durch Zentrifugation (5 min, 3.800\*g) wurden die Zellen sedimentiert und nacheinander mit 1 ml A.dest. und 1ml TE/Lithiumacetat gewaschen. Danach wurde die Zellen mit TE/Lithiumacetat auf eine Dichte von  $1 \times 10^9$  Zellen/ml verdünnt und von dieser kompetenten Zellsuspension wurden 50 µl pro Transformation verwandt. Als Träger der zu transformierenden DNA wurde hitzedenaturierte Heringsperma-DNA benutzt. Dazu wurde diese für 5 min bei 100 °C aufgeköcht und anschließend 2 min auf Eis sehr schnell abgekühlt. 50 µg Heringsperma-DNA wurde dann zusammen mit 1 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA der Zellsuspension zugefügt. Durch Zugabe von 300 µl PEG/TE/Lithiumacetat wurden Zellwand und Zellmembran permeabilisiert. Nach intensivem Vortexen erfolgte eine Inkubation für min 30 min bei 25 °C auf einem Rotator und im Anschluss ein

Hitzeschock bei 42 °C für 15 min. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1 min, 13.700 x g) und mit 1 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Der Zellschlag wurde abschließend in 100 µl A.dest. aufgenommen, auf entsprechendem Selektivagar ausplattiert und bebrütet. Gleichbehandelte Ansätze, denen keine DNA zugesetzt wurde, dienten als Negativkontrolle.

### 4.11.3 Fluoreszenz-Mikroskopie (modifiziert nach (Bossie et al., 1992))

#### 4.11.3.1 Lokalisation von GFP-fusionierten Proteinen

|   |      |         |                                  |
|---|------|---------|----------------------------------|
| <u>Phosphatpuffer (pH 6,5):</u>           | 33   | mM      | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>  |
|   | 67   | mM      | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  |
| <u>P-Lösung (pH 6,5):</u>                 | 33   | mM      | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>  |
|   | 67   | mM      | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  |
|   | 1,2  | M       | Sorbitol                         |
| <u>Eindeckmittel (pH 8,0):</u>            | 2    | % (w/v) | N-Propyl-Gallat                  |
|   | 80   | % (v/v) | Glycerin                         |
|   | 27,4 | mM      | NaCl                             |
|   | 0,5  | mM      | KCl                              |
|   | 1,6  | mM      | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> |
|   | 0,4  | mM      | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  |
| <u>Antikörper-Waschpuffer 2 (pH 9,5):</u> | 0,1  | M       | Tris/HCl                         |
|   | 0,1  | M       | NaCl                             |

Für die GFP-Mikroskopie wurden 5 ml einer Hefe-Zellkultur bis zu einer Dichte von 1 – 3 x 10<sup>7</sup> Zellen bei 25°C im Rotator kultiviert. Falls für den Versuch nötig, wurde die Kultur, wenn sie die oben genannte Dichte erreicht hatte, vor der weiteren Behandlung einer Temperaturverschiebung auf eine geeignete Temperatur für einen bestimmten Zeitraum unterzogen.

Zunächst wurden die Hefezellen fixiert. Dazu wurden 350 µl einer 37 %igen Formaldehyd- lösung dazugeben und anschließend wurde sofort durch Zentrifugation (5 min, 3.800 x g) sedimentiert. Einmalig wurde daraufhin mit 0,1 M Phosphatpuffer und anschließend mit P-Lösung gewaschen. Der Zellschlag wurde am Ende wieder in P-Lösung aufgenommen. Das Volumen variierte dabei zwischen 100 µl und 1 ml, um eine geeignete Dichte für das Auftragen auf einen teflonbeschichteten Objektträger zu erreichen. Bevor die Proben aufgetragen werden konnten, wurden die Objektträger für 5 min mit Polylysin 0,3% behandelt und anschließend mit A. dest. gewaschen und

getrocknet. Hierdurch bildete sich eine polykationische Matrix, die im Folgenden eine Adhäsion der negativ geladenen Zelloberflächen bewirkte. 20 µl des auf eine adäquate Dichte eingestellten Probenansatzes wurden auf den Objektträger pipettiert. Dieser wurde dann in eine kleine feuchte Kammer überführt, die ein Austrocknen der Proben verhindern sollte. Auch für alle folgenden Schritte blieb der Objektträger mit den Proben in der Kammer. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und es folgten zwei Waschschrte mit Antikörper-Waschpuffer II. Die Objektträger wurden dann im Dunkeln luftgetrocknet, mit Eindeckmittel, das dem Schutz vor schnellem Ausbleichen der Fluoreszenzsignale dient, beschichtet und zum Schluss mit einem Deckglas versehen.

#### 4.11.3.2 DNA-Färbung mit DAPI

Generell werden die Hefezellen wie unter 4.11.3.1 beschrieben mit 37%igem Formaldehyd fixiert, gewaschen und auf den vorbehandelten Objektträger aufgebracht. Nach der Inkubationszeit der Zellen auf dem Objektträger von 15 min wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und die Zellen dann für 5 min mit einer frischen 0,5 % (v/v) Triton-X-100-Lösung permeabilisiert. Danach wurde zunächst mit P-Lösung und dann mit Antikörper-Waschlösung II gewaschen. Die DNA in den Zellkerne wurden mit dem DAPI-Farbstoff (30 µM in Antikörper-Waschpuffer II) für 5 min inkubiert. Von diesem Schritt an erfolgten alle weiteren Schritte möglichst unter Lichtausschluss, um den DAPI-Farbstoff zu erhalten. Nach Entfernung der Farbstoff-Lösung wurden die Zellen zweimal mit Antikörper-Waschpuffer II gewaschen und anschließend getrocknet und eingedeckelt (4.11.3.1).

#### 4.11.3.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) zum Nachweis von mRNA

(modifiziert nach Amberg et al., 1992)

|                                  |      |         |                        |
|----------------------------------|------|---------|------------------------|
| <u>SSC (1 ×, pH 7,4):</u>        | 15   | mM      | Natriumcitrat          |
|                                  | 150  | mM      | NaCl                   |
| <u>Prähybridisierungslösung:</u> | 50   | % (v/v) | deionisiertes Formamid |
|                                  | 60   | mM      | Natriumcitrat          |
|                                  | 600  | mM      | NaCl                   |
|                                  | 0,02 | % (w/v) | Ficoll                 |
|                                  | 0,02 | % (w/v) | Polyvinylpyrrolidon    |
|                                  | 0,02 | % (w/v) | BSA                    |
|                                  | 10   | % (w/v) | Dextransulfat          |

|              |   |
|--------------|---|
| 0,05 % (w/v) | tRNA                                      |
| 0,05 % (w/v) | hitzenedenaturiertes<br>Heringssperma DNA |

Zur *in situ*-Detektion von poly(A)<sup>+</sup>-RNA wurden chemisch, mit 37%igem Formaldehyd fixierte Hefezellen (4.11.3.1) verwendet. Zunächst erfolgte dann der enzymatische Verdau der Zellwand. Dazu wurden 100 µl in P-Lösung aufgenommener, fixierte Hefezelle mit 1 µl 1 M DTT versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1 U Zymolase (4.6) begann der enzymatische Verdau der Zellwand, dessen Fortschreiten permanent phasenkontrastmikroskopisch verfolgt wurde. Sobald die Hälfte der Zellen dunkel erschien, wurde die Reaktion durch Zentrifugation (1 min, 16.100 × g, RT) gestoppt. Es folgten zwei Waschschrte mit je 1 ml P-Lösung. Schließlich wurden die Sphäroplasten vorsichtig in 100 µl P-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden auf einen vorgehandelten (4.11.3.1), teflonbeschichteten Objekträger aufgetragen und 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Zellmembran durch eine 5minütige Behandlung mit frisch angesetzten 0,5% (v/v) Triton X-100 in P-Lösung permeabilisiert. Im Anschluss wurden die Proben kurz mit P-Lösung gewaschen und für 2 min bei RT in frisch angesetztem 0,1 M Triethanolamin (pH 8,0) äquibriert. Es folgte eine Blockierung polarer Gruppen durch Behandlung mit 0,25 % (v/v) Essigsäureanhydrid in 0,1 M Triethanolamin (pH 8,0) für 10 min bei RT. Eine Inkubation mit Prähybridisierungslösung für 1 h bei 37 °C diente der Verhinderung unspezifischer Sondenbindungen. Die Sonde (dT<sub>50</sub>, 5'- und 3'-Ende Cyanin 3-markiert, BioSpring, Frankfurt) wurde auf eine Konzentration von 0,2 µM in Prähybridisierungslösung verdünnt und für eine Inkubation ü.N. bei 37 °C in einer Feuchtekammer auf die Zellen gegeben. Am nächsten Tag erfolgte die Entfernung überschüssiger Sondenmoleküle erfolgte durch mehrmaliges Waschen (1h 2×SSC bei RT, 1h 1×SSC bei RT, 30 min 0,5×SSC bei 37 °C, 30 min 0,5×SSC bei RT). Die Proben wurden anschließend mit dem DNA-spezifischen Fluorochrom DAPI gefärbt (4.11.3.2) und mit einem Deckglas bedeckt (4.11.3.1).

#### 4.11.3.4 Auswertung am Fluoreszenzmikroskop

Die mikroskopische Auswertung der unter 4.11.3 genannten Methoden erfolgte unter Verwendung des Leitz Aristoplan Fluoreszenz-Mikroskops mit den Filtereinheiten I3 für GFP, N2.1 für Cyanin 3 und TRSC und A für DAPI. Zur digitalen Bildaufnahme und -verarbeitung war diesem die Kamera Orca C4742-95 mit dazugehörigem Computerprogramm HPD-CP Version 2.6.2.0 angeschlossen.

#### 4.11.4 Sporulation und Tetradenanalyse (Rose et al., 1987)

Im Vorfeld einer Tetradenanalyse wurden zwei haploide Hefestämme unterschiedlichen Kreuzungstyps auf YPD-Nährboden (4.9.2) vermischt und ü.N. bei 25 °C bebrütet. Die derart erzeugten diploiden Zellen wurden zur Induktion der Sporulation in 2 ml Super-SPO-Medium (4.9.2) angeimpft und für 2 bis 3 Tage bei 25 °C auf einem Brutroller (4.1) inkubiert. Das Ausmaß der Ascibildung konnte mikroskopisch verfolgt werden. Zur Separierung der Sporen wurden Zellen aus 50 µl Kultur durch Zentrifugation (1 min, 16.100 × g,) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 50 µl P-Lösung (4.11.3.1) resuspendiert, mit 0,5 U Zymolase (4.6) versetzt und bis zur enzymatischen Lyse der Ascuswand und dem Austreten der Sporen ca. 45 min bei RT inkubiert. Durch erneuter Zentrifugation (1 min, 16.100 × g, RT) und Aufnahme des Niederschlages in 200 µl P-Lösung wurde dieser Vorgang gestoppt. 50 µl dieser Suspension wurden in Form einer geraden Linie auf YPD-Agar aufgetragen. Mit Hilfe einer Glasnadel, die über einen am Mikroskop (4.1) befestigten Mikromanipulator bewegt wurde, konnten die Sporen einer Tetrade getrennt und innerhalb eines Koordinatensystems geordnet auf dem Agar abgelegt werden. Nach 2 bis 4 Tagen Inkubation der Agarplatte bei 25 °C wurde der Phänotyp der gekeimten Sporen auf Selektivmedium (4.9.2) analysiert.

### 4.12 Proteinbiochemische Methoden

#### 4.12.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) (Laemmli, 1970)

##### Sammelgel (5 %, pH 6,8):

|              |   |
|--------------|---|
| 16,7 % (v/v) | 30 % (w/v) Acrylamid-Stammlösung mit 0,8 % (w/v) Bisacrylamid |
| 125 mM       | Tris/HCl  |
| 0,1% (w/v)   | SDS   |
| 0,1% (w/v)   | APS   |
| 0,1% (v/v)   | TEMED   |

##### Trenngel (11 %, pH 8,8):

|            |   |
|------------|---|
| 37 % (v/v) | 30 % (w/v) Acrylamid-Stammlösung mit 0,8 % (w/v) Bisacrylamid |
| 325 mM     | Tris/HCl  |

|             |       |
|-------------|-------|
| 0,1% (w/v)  | SDS   |
| 0,1% (w/v)  | APS   |
| 0,05% (v/v) | TEMED |

Für Trenngele mit abweichender Acrylamid-Konzentration wurde der Anteil der Acrylamid-Stammlösung entsprechend variiert.

|  |      |         |                   |
|--|------|---------|-------------------|
| <u>Elektrophoresepuffer:</u>             | 25   | mM      | Tris              |
|  | 250  | mM      | Glycin            |
|  | 0,02 | % (w/v) | SDS               |
| <u>SDS-Probenpuffer (1fach, pH 6,8):</u> | 50   | mM      | Tris/HCl          |
|  | 10   | % (v/v) | Glycerin          |
|  | 2,4  | % (w/v) | SDS               |
|  | 5    | % (v/v) | β-Mercaptoethanol |
|  | 0,02 | % (w/v) | Bromphenolblau    |

Die Auftrennung proteinhaltiger Proben erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem. SDS dient dabei als denaturierende Substanz, so dass nur die Masse als alleinige Determinante für die Wandergeschwindigkeit gilt. Die Elektrophorese wurde in vertikalen Gelapparaturen bei einer konstanten Spannung von 60 bis 100 V pro Gel durchgeführt, wobei der Elektrophoresepuffer sowohl als Anoden- als auch Kathodenpuffer Verwendung fand. Die in SDS-Probenpuffer gelösten Proteine wurden durch 5 min Aufkochen bei 95 °C denaturiert und zusammen mit dem Molekulargewichtsstandard „BenchMark Prestained Protein Ladder“ (4.2) auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung wurden die Proteine mittels Coomassie-Färbung (4.12.2) sichtbar gemacht und analysiert.

#### 4.12.2 Coomassie-Färbung (Neuhoff et al., 1988)

|                        |      |         |                                  |
|------------------------|------|---------|----------------------------------|
| <u>Färbelösung:</u>    | 0,25 | % (w/v) | „Coomassie brilliant blue R-250“ |
|                        | 50   | % (v/v) | Methanol                         |
|                        | 10   | % (v/v) | Essigsäure                       |
| <u>Entfärbelösung:</u> | 5    | % (v/v) | Methanol                         |
|                        | 7    | % (v/v) | Essigsäure                       |

Zur gleichzeitigen Fixierung und Färbung elektrophoretisch aufgetrennter Proteine wurde das SDS-Polyacrylamidgel (4.12.1) für etwa 30 min bei RT in Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde so lange die Entfärbelösung angewendet, bis die

Proteinbanden deutlich hervortraten. Um den Vorgang zu beschleunigen, wurde in einigen Fällen, das Gel in der Entfärbelösung langsam und vorsichtig in der Mikrowelle erwärmt.

### **4.13 Proteinexpression in *Escherichia coli***

Vor allem für in vitro Versuche oder für die Herstellung von Antikörpern werden aufgereinigte Proteine von hohem Reinheitsgrad in großer Menge benötigt. Für die Proteinexpression wurden Vektoren verwendet, die eine Sequenz von sechs Histidin Resten („His-tag“) enthält. Diese Sequenz bildet die Grundlage für die spätere Aufreinigung der gewünschten Proteine. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Expressionsvektoren und -systeme verwendet:

Der Vektor pQE60 enthält den Bakteriophagen T5-Promotor, der von der *E. coli*-RNA-Polymerase erkannt wird und zwei *lac*-Operon-Sequenzen, die zur Repression des T5-Promotors dienen. Damit dies funktioniert, muß sichergestellt sein, dass eine ausreichende Menge *lac*-Repressor vorhanden war. Dieser bindet an das *lac*-Operon und verhindert so den Start der Transkription. Der Bakterienstamm *MI5* enthält durch das Plasmid pREP4 und damit eine große Menge an *lac*-Repressor. Durch Zugabe von IPTG kann die Proteinexpression induziert werden, da dieses an den Repressor bindet und somit die Blockierung des *lac*-Operons aufhebt.

Im Vektor pET-15B sind die Zielgenen unter Kontrolle des Bakteriophagen T7 Promotors, der nur von der T7-RNA-Polymerase erkannt wird. Zur Klonierung der entsprechenden Plasmide wurde der Bakterienstamm *JM109* verwendet, während zur Expression die Plasmide in *BL21(DE3)* transformiert wurden. In diesem Stamm wird das T7-RNA-Polymerase Gen von dem *lacUV5*-Promotor reguliert, der durch IPTG induziert werden kann.

#### **4.13.1 Induktion der Proteinexpression**

Das entsprechend jeweiligen *E. coli* Stämme wurden mit den präparierte Plasmide zur Expression (4.13) transformiert. Entsprechenden Antibiotika zur Selektion wurden dem Medium zugefügt. Für analytische Zwecken wurden 5 ml LB-Medium (4.9.1) entsprechend beimpft und im Schüttelinkubator bei 37°C und 180 UpM über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden 50 ml LB-Medium mit einem Milliliter der Vorkultur angeimpft. Für präparative Zecke wurden 1-2l LB-Medium im Verhältnis 1:50 mit einer nichtinduzierten-Übernachtskultur inokuliert. Danach wurde dann wieder



im Schüttelinkubator (37°C, 180 UpM) bebrütet bis eine Dichte von  $OD_{600} = \sim 0,6$  erreicht war. Dann wurde 1 mM IPTG hinzugegeben und die Proteinexpression für 4 Stunden im Schüttelinkubator (37°C, 180 UpM) induziert bebrütet. Jede Stunde wurde der Kultur 1ml entnommen. Dieser wurde zentrifugiert, der Niederschlag in 1fach SDS-Puffer (4.12.1) aufgenommen und dann bei –80°C bis zum Gebrauch verwahrt. Durch Zentrifugation (15 min,  $3.800 \times g$ ) und Einfrieren des Zellniederschlages bei –80°C wurde die Induktion gestoppt.

#### 4.13.2 Bakterienaufschluss unter nativen Bedingungen

|                    |     |    |                                  |
|--------------------|-----|----|----------------------------------|
| Lysepuffer (pH 8): | 50  | mM | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
|                    | 300 | mM | NaCl                             |
|                    | 10  | mM | Imidazol                         |

1 Tablette Boehringer Proteaseinhibitor-Mischung ohne EDTA/10 ml Lyse-Puffer

Die sedimentierte *E. coli*-Kultur wurde langsam auf Eis aufgetaut, dann in 1-5ml Lyse-Puffer + 1 mg/ml Lysozym und 1 mM MgCl resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 30 min auf Eis inkubiert, bevor die Zellwände mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen werden konnten. Dazu wurden die Zellen für 2 mal 2 min auf Eis behandelt (Puls 50%, Stärke 2-3). Abschließend wurde sedimentiert (15 min,  $3.800 \times g$ , 4°C). Der Überstand wurde sofort für die weitere Affinitätsaufreinigung (4.13.3) benutzt.

#### 4.13.3 Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie

|                       |           |    |                                  |
|-----------------------|-----------|----|----------------------------------|
| Lysepuffer:           | s. 4.13.2 |    |                                  |
| Waschpuffer (pH 8):   | 50        | mM | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
|                       | 300       | mM | NaCl                             |
|                       | 20        | mM | Imidazol                         |
| Elutionspuffer (pH 8) | 50        | mM | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
|                       | 300       | mM | NaCl                             |
|                       | 250       | mM | Imidazol                         |

Die weitere Aufreinigung erfolgte unter nativen Bedingungen über Ni-NTA-Zentrifugationssäulen (Quiagen, Hilden) genau nach Angaben.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Nab2-Domänen-Tausch

Nab2 ist für die Zellen ein essentielles Protein, dass als poly(A)<sup>+</sup>-RNA-bindendes Protein identifiziert wurde. Es pendelt zwischen Zytoplasma und Zellkern und ist nach Einstellung eines Gleichgewichtes vorwiegend im Zellkern lokalisiert (Anderson et al., 1993; Duncan et al., 2000; Green et al., 2002b; Lee und Aitchison, 1999b). Der Export ist abhängig von funktionierender poly(A)<sup>+</sup>-RNA-Synthese und von Methylierungen durch die Argininmethyltransferase Hmt1 (Green et al., 2002b). Es wird vom Importin Kap104 in den Zellkern importiert (Aitchison et al., 1996). Ein Fehlen von Nab2 führt zur Akkumulation von RNAs mit hyperadenylierten poly(A)<sup>+</sup>-Schwänzen im Zellkern (Hector et al., 2002). Nab2 besteht aus vier Domänen: einer N-terminalen Domäne, einer Glutamin-reichen Domäne, einer RGG-Domäne und einer C-terminalen Domäne, die mehrere Zinkfinger-Motive enthält (Anderson et al., 1993) (Abb. 4 und 5). Die N-terminale Domäne wird für einen effizienten Export von Nab2 und poly(A)<sup>+</sup>-RNA benötigt (Marfatia et al., 2003). In der RGG-Domäne befindet sich die Stelle der Methylierung durch Hmt1 (Green et al., 2002b), gleichzeitig beinhaltet sie das NLS und die Bindestelle für Kap104 (Lee und Aitchison, 1999b; Truant et al., 1998).

In einem Domänen austauschversuch sollte der Austausch der Kap104-Bindedomäne gegen die Mtr10-Bindedomäne von Npl3 untersucht werden. Dazu wurden wie unter 4.10.13 beschrieben, zunächst verschiedene Konstrukte hergestellt, welche die unterschiedlichen Varianten von nab2 als Fusionsprotein mit GFP unter dem *NAB2*-Promoter exprimieren sollten.

Als erstes wurde das Konstrukt P<sub>NAB2</sub>:*nab2Δ200-249-GFP* (pHK584) hergestellt. (Abb. 5) Die Region AA 200-249 dient als funktionelles NLS, welches das Importin Kap104

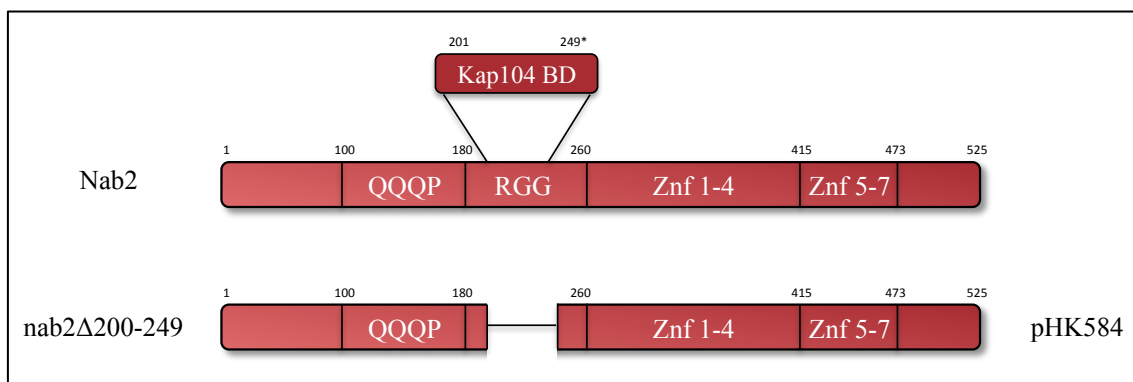
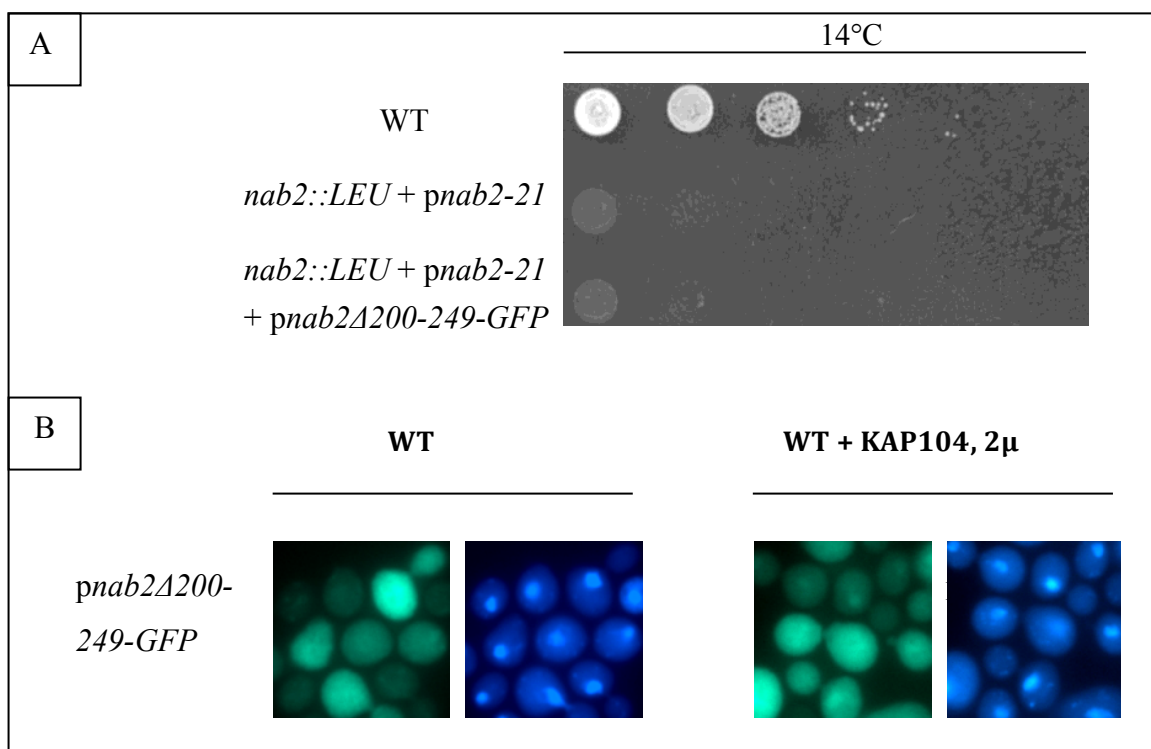


Abb. 5. Schematische Darstellung von Nab2 und nab2(Δ200-249) (pHK584).

bindet (Lee und Aitchison, 1999b). Dieses Konstrukt wurde auf seine Funktionalität getestet. Dazu wurde ein *nab2*-Deletionsstamm, der ein Plasmid enthält, das für *nab2-21* kodiert, mit dem Konstrukt pHK584 transformiert (4.10.11), (HKY353, 4.3.2). *Nab2-21* hat die Deletion der Aminosäurenreste 424-445, dadurch fehlen Teile der sechsten und siebten CH<sub>3</sub>-Wiederholungen in der Zinkfinger-Domäne, diese sind für die poly(A)<sup>+</sup>-RNA-Bindung wichtig (Abb. 4 und 5). Dieser Stamm weist einen Wachstumsdefekt bei 14°C auf (Hector et al., 2002). Das Wachstum dieser mit pHK584 transformierten Zellen wurde bei 14°C beobachtet. Als Kontrollen wurden HKY36 (WT) und HKY 353 mitgeführt. Es zeigte sich sowohl für den Deletionsstamm mit *nab2-21* (HKY353) als auch den mit *nab2-21* und *nab2Δ200-249* transformierten Stamm (HKY353 + pHK584) kein Wachstum bei nicht-permissiver Temperatur von 14°C. *Nab2Δ200-249* ist offensichtlich nicht in der Lage funktionelles Nab2 zu ersetzen (Abb.6.A). Im Gleichgewicht ist Nab2 überwiegend im Zellkern lokalisiert (Anderson et al., 1993; Duncan et al., 2000; Lee und Aitchison, 1999a). Die Lokalisation von *nab2Δ200-249* in *S. cerevisiae* wurde mit Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Dazu



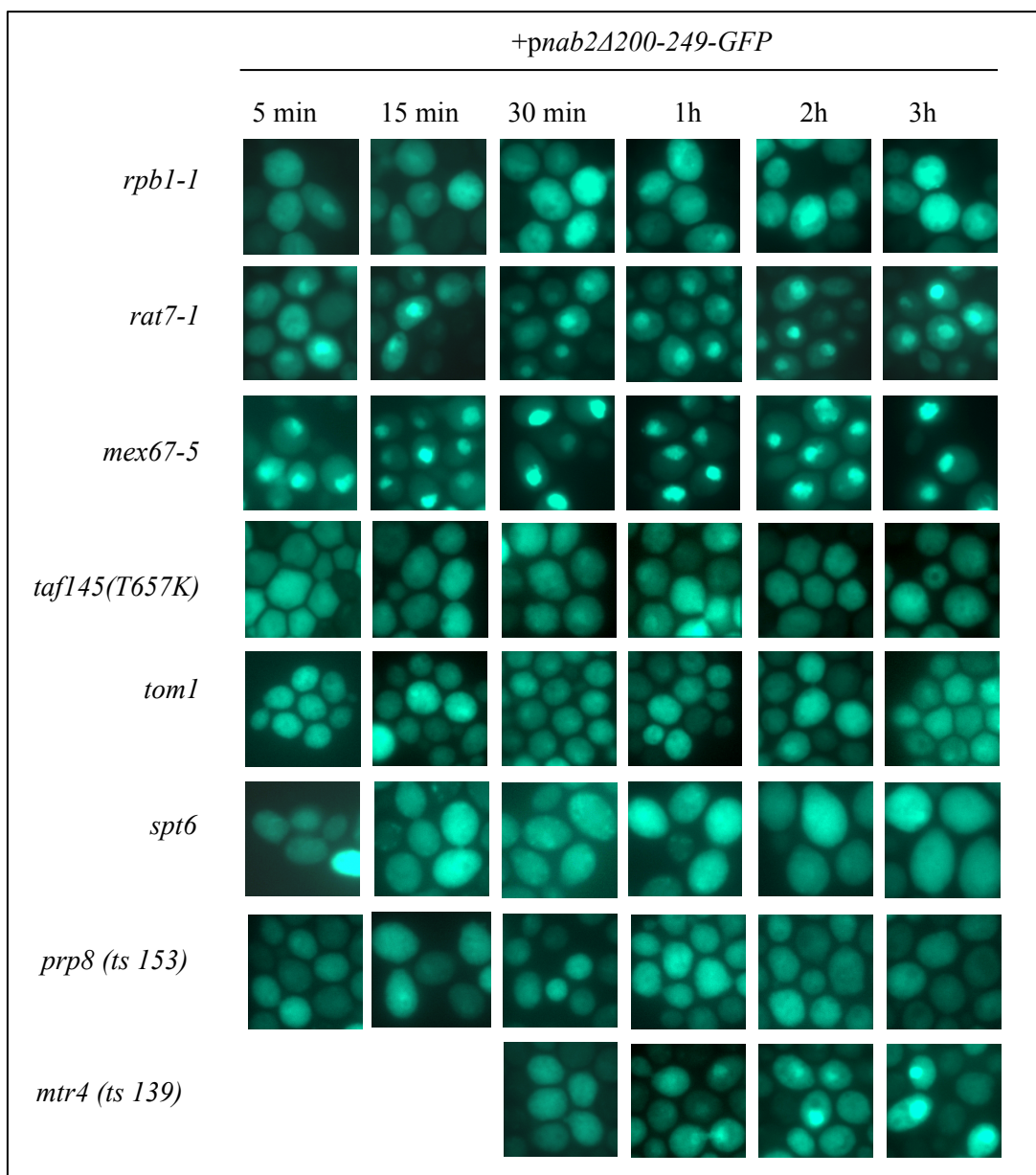
**Abb. 6. Funktionalität von *nab2pΔ200-249*.** A: Die *S. cerevisiae*-Stämme HKY36 (WT), HKY353( $\Delta nab2$  + *nab2p-21*) und HKY353 ( $\Delta nab2$  + *nab2p-21*) + pHK584 (*nab2Δ200-249*) wurden von gleicher Zellzahl ausgehend auf eine –ura-Selektionsplatte aufgetropft und anschließend für 6 Tage bei 14°C inkubiert. B: Wildtypzellen (HKY35) wurden mit  $P_{NAB2}::nab2p(\Delta 200-249)$ , *URA3 CEN6* und  $P::KAP104 TRP$  2μ transformiert und bei 25°C bis zur logarithmischen Phase angezogen. Selektion erfolgte dabei auf URA und TRP. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt. Gezeigt ist die Lokalisation von *nab2pΔ200-249-GFP*.

wurden WT-Zellen (HKY35) mit dem Plasmid pHK584 (*nab2Δ200-249-GFP*) transformiert (4.10.11) und bis zur logarithmischen Phase bei 25°C angezogen, bevor sie fixiert wurden. Abb. 6.B zeigt für *nab2Δ200-249-GFP* eine Lokalisation in der gesamten Zelle. Auch die Anwesenheit eines 2μ-Plasmids, auf dem *KAP104* (pHK186) kodiert und zu einer Überexpression von Kap104 führt, ändert diese Lokalisation nicht. Daraus lässt sich folgern, dass entweder der Import dieser *nab2*-Mutante völlig blockiert ist, oder aber so stark verlangsamt, dass selbst ein vermehrtes Vorliegen des Importrezeptors Kap104 nicht in der Lage ist, das eingestellte Lokalisationsgleichgewicht zu ändern.

Ob der Import dennoch funktioniert wurde überprüft, in dem ein *rat7-1*-Stamm (HKY 124) mit *nab2Δ200-249-GFP* transformiert wurde und dann die Lokalisation der *nab2*-Mutante in diesem Stamm bestimmt wurde (Abb. 7). Für Zellen, die das temperatursensitive Allel *rat7-1* des Nukleoporins Rat7/Nup159 enthalten, ist bekannt, dass bei nicht-permissiver Temperatur der Export von mRNPs blockiert ist (Del Priore et al., 1996; Gorsch et al., 1995; Krebber et al., 1999). In diesem Stamm zeigte sich eine vorwiegend nukleäre Lokalisation von *nab2Δ200-249-GFP* (Abb. 7). Dies impliziert, dass Import zumindest nach der Synthese des Proteins stattfinden muss und ein Export des Proteins aus dem Zellkern nicht stattfindet. Ob dieser Import abhängig oder unabhängig von Kap104 geschieht, kann hier nicht ausreichend geklärt werden. Ähnlich wie in *rat7-1*-Zellen zeigte *nab2Δ200-249-GFP* auch in *mex67-5* Zellen (HKY315) nach Inkubation bei 37°C nach 5 min eine deutliche nukleäre Lokalisation (Abb.7). In *mex67-5*-Zellen ist der mRNA-Export blockiert (Segref et al., 1997).

Des Weiteren wurde der Frage nachgegangen, ob der Export von *nab2Δ200-249* von mRNA-Translation abhängig ist. Dazu wurden *rpb1-1* Zellen (HKY319) mit der Mutante transformiert (4.10.11). Zellen dieses Stammes exprimieren eine nicht funktionelle RNA-Polymerase II, wenn sie bei nicht-permissiver Temperatur von 37°C inkubiert werden. Sollte der Export, der in dieser Arbeit hergestellten *nab2*-Mutanten von mRNA-abhängig sein, würde eine nukleäre Lokalisation erwartet werden. Es zeigte sich allerdings auch nach einer Inkubation der transformierten Zellen von 3h bei 37°C eine zytoplasmatische Lokalisation des GFP-Fusionsproteins (Abb.7). Dies bedeutet, *nab2Δ200-249* wird auch unabhängig von der mRNA aus dem Zellkern exportiert, wenn keine funktionsfähige mRNA vorliegt.

Um die Funktion dieser Mutante weiter zu klären, wurden verschiedene Mutationsstämme transformiert (4.10.11), in denen die Lokalisation des mutierten



**Abb. 7. Lokalisationsvergleich für *nab2*Δ200-249-GFP.** Die angegebenen Hefestämme wurden mit dem Konstrukt *p<sub>NAB2</sub>:nab2*Δ200-249 (pHK584) transformiert. Die Zellen wurden bei 25°C bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Dann erfolgte eine Inkubation bei 37°C für die jeweils angegebenen Zeitspannen. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde *nab2*Δ200-249-GFP detektiert.

Proteins über GFP-Fluoreszenzmikroskopie bestimmt wurde (4.11.3, Abb. 7). In HKY258 ist *TOM1* deletiert. Tom1 ist eine E3-Ubiquitin-Ligase, die für den effizienten Export von Nab2 assoziierten mRNAs zuständig ist (Duncan et al., 2000; Iglesias et al., 2010). Auch für den Export von Gbp2 und Hrb1 assoziierter mRNAs scheint Ubiquitinierung durch Tom1 wichtig zu sein (Hacker und Krebber, 2004). Im Gegensatz dazu sind Npl3 assoziierte mRNPs nicht von der Ubiquitinierung durch Tom1 abhängig (Duncan et al., 2000). Funktionelles Nab2 zeigt in *TOM1* eine nukleäre Lokalisation, für *nab2*Δ200-249 zeigte sich eine zytoplasmatische Lokalisation (Abb. 7).

Das bedeutet, dass *nab2Δ200-249* im Gegensatz zu Nab2 auch unabhängig von den Nab2-assoziierten mRNAs exportiert wird. Es ist unklar, ob *nab2Δ200-249* dabei an anderen mRNAs oder unabhängig von mRNA exportiert wird. Eine andere Möglichkeit für die zytoplasmatische Lokalisation von *nab2Δ200-249* im *TOM1*-Deletionsstamm wäre, dass der Effekt der *TOM1*-Deletion aufgrund des zu langsamen Pendelns von *nab2Δ200-249* zu gering ausgeprägt ist.

Ein weiterer verwendeter Stamm war HKY356, in dem *taf145-T657K* exprimiert wird. Taf145 ist eine Komponente des generellen Transkriptionsfaktors TFIID. Mittels Deletionsstudien konnte man nachweisen, dass Taf145 nur für die Expression von bestimmten Subsets von Genen benötigt wird, darunter unter anderem ribosomale Proteine (Tsukihashi et al., 2000). Die Expression von *taf145-T657K* führt zu einem temperatursensitiven Defekt, bei dem die Synthese dieser RNAs eingeschränkt ist (Tsukihashi et al., 2000). Außerdem wurde noch die Lokalisation in den temperatursensitiven Mutanten ts 153 (*prp8*), ts 139 (*mtr4*) (beide diese Arbeit, 5.2.3.1 und 5.2.3.2) und ts 14 (*spt6*) (Hacker und Krebber, 2004) überprüft. In allen diesen mutierten Hefestämmen war *nab2Δ200-249* auch nach 3-stündiger Inkubation bei nicht-permissiver Temperatur von 37°C mit Ausnahme von ts 139 (*mtr4*) zytoplasmatisch lokalisiert (Abb.7). Für *nab2Δ200-249* in *mtr4* (ts 139) tritt eine nukleäre Lokalisation ähnlich wie für Hrb1, Gbp2 und Npl3 erst nach einer Stunde Inkubation bei 37°C auf. Prozentuell wiesen etwa 10-20% der Zellen ein Kernsignal auf.

## 5.2 Identifizierung von Proteinen, die in den Export Gbp2-gebundener mRNAs involviert sind.

Für Gbp2 konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Serinresten in der SR-Domäne entscheidend für die Lokalisation des Proteins in der Zelle ist (Windgassen und Krebber, 2003). Die Mutanten *gbp2*(S13/15/17A)-GFP, *gbp2*(S15A)-GFP und *gbp2*(S17A)-GFP sind hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert, während Gbp2-GFP vorwiegend im Zellkern lokalisiert ist (Windgassen und Krebber, 2003). Es ist möglich, dass Gbp2 durch diese spezifischen Mutationen nicht mehr phosphoryliert werden kann, was z.B. entweder den Import des Proteins in den Kern stören oder die Dissoziation von der mRNA erschweren könnte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Mtr10 die ansonsten zytoplasmatische Lokalisation von *gbp2*(S13/15/17A)-GFP wieder in eine nukleäre zurückführen kann (Windgassen und Krebber, 2003). Dies zeigt, dass der Import dieser *gbp2*-Mutante nicht vollständig blockiert ist, sondern das Gleichgewicht zwischen Import und Export verschoben ist (Abb.8A). Das *gbp2*(S15A)-GFP in einem *RPB1*-Mutationstamm, in diesen Zellen wird keine funktionsfähige RNA-Polymerase exprimiert (*rbp1-1*), im Zellkern lokalisiert ist, zeigt, dass der von Export von *gbp2*(S15A)-GFP an mRNA Export gebunden ist (Windgassen und Krebber, 2003).

Auf dieser Grundlage wurde ein Versuchsmodell entwickelt, dessen Ziel es ist, neue

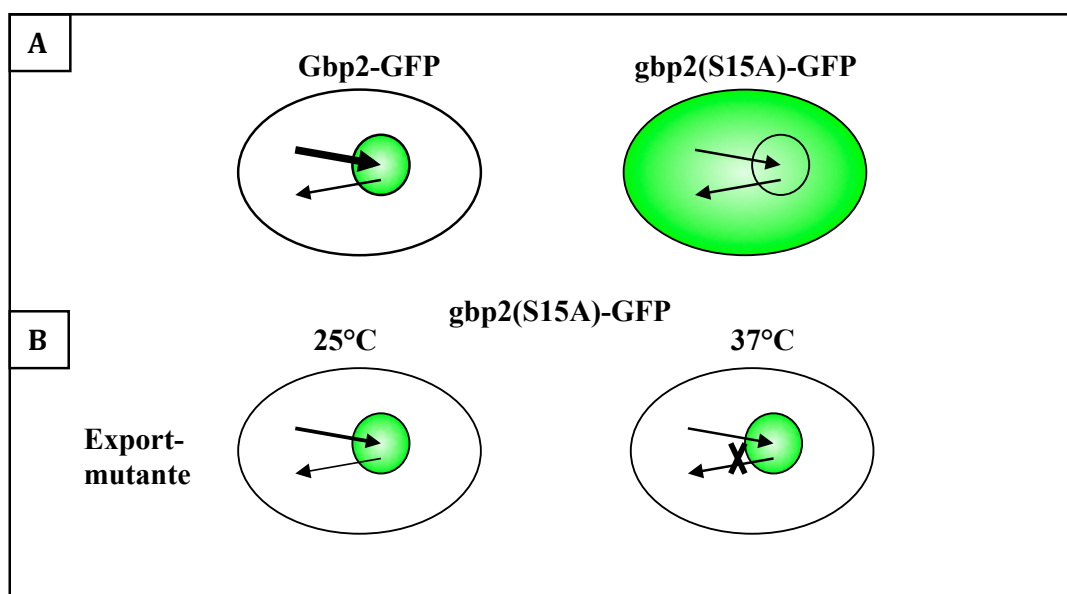


Abb. 8. Schematische Darstellung der Gbp2-GFP-Fusionsproteine in Wildtyp (A) und in einer Exportmutante (B).

Exportfaktoren oder Faktoren, die zu einer Blockade des mRNA-Exportes von gbp2(S15A)-GFP führen können, zu identifizieren. Mutationen in solchen Proteinen würden dann zu einer nukleären Lokalisation von gbp2(S15A)-GFP führen. Ziel war es temperatursensitive (ts) Mutanten zu finden, die den Exportdefekt nur bei nicht-permissiver Temperatur zeigen (Abb. 8B) Dazu wurden mit *gbp2(S15A)-GFP* (pHK431, 4.4) transformierte Wildtyp-Zellen (HKY36) einer ungerichteten, chemischen EMS-Mutagenese unterzogen. Die Zellen wurde dann auf Selektionsplatten für 3-5 Tage inkubiert, bevor sie durch Überstempeln vervielfacht wurden. Die so erzeugten Duplikate wurden bei 25°C und bei 37°C inkubiert. Es wurden nur solche Klone isoliert, die einen Wachstumsdefekt bei 37°C aufwiesen. Diese wurden auf einen Gbp2-assoziierten mRNA-Export Defekt untersucht. Bei nicht-permissiver Temperatur sollte gbp2(S15A)-GFP hauptsächlich wieder im Zellkern lokalisiert sein. Dabei kann entweder das Gleichgewicht so verschoben sein, dass die Importrate wieder die Exportrate übersteigt (ähnlich wie bei Gbp2 in WT), oder der Export von mRNA ist völlig blockiert (Abb. 8B).

Auf diese Weise identifizierte ts Mutanten waren bereits im Labor vorhanden.

### 5.2.1 Identifizierung von möglichen Exportmutanten

In einem ersten Schritt wurden unter den TS-Mutanten solche identifiziert, in denen sich eine nukleäre Lokalisation von gbp2(S15A)-GFP zeigte. Dazu wurden sie bis zum Erreichen des logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C bebrütet und anschließend für 30 min und 3h bei der nicht-permissiven Temperatur von 37°C inkubiert. Die Zellen wurden zu den entsprechenden Zeiten fixiert und die intrazelluläre Lokalisation von gbp2(S15A)-GFP mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt (4.11.3).

Tabelle 5 zeigt eine Auflistung der in dieser Arbeit untersuchten ts-Mutanten. Für die ts-Mutanten 139, 150, 153, 157 und 160 konnte auf diese Weise eine nukleäre Lokalisation von gbp2(S15A)-GFP bei 37°C identifiziert werden (Abb. 9).

### 5.2.2 Charakterisierung der identifizierten Exportmutanten

Bevor mit Hilfe einer genomischen Plasmidbibliothek von *S. cerevisiae* der entsprechende Defekt, der zur nukleären Lokalisation von gbp2(S15A) in den Mutanten ts 139, 150, 153, 157 und 160 führt komplementiert und anschließend identifiziert werden kann, müssen die Mutanten genauer charakterisiert werden. Dazu gehört der genaue Zeitverlauf der Kernlokalisation, die exakte Bestimmung der nicht-permissiven



Temperatur, es muss eine rezessive Mutation vorliegen und es muss sichergestellt sein, die Kernlokalisierung von gbp2(S15A)-GFP in diesen TS-Mutanten auf einer einzigen und nicht auf mehreren Mutationen beruht. Diese Schritte werden in den folgenden Abschnitten im Detail beschrieben.

| ts-Mutante        | Lokalisation von gbp2-(S15A)-GFP | Stand der Charakterisierung bzw. Grund für die Aussortierung        |
|-------------------|----------------------------------|---|
| 135               | zytoplasmatisch                  |   |
| <b>139</b>        | <b>nukleär</b>                   | <i>MTR4</i> Expression hebt Phänotyp auf                            |
| 145-149           | zytoplasmatisch                  |   |
| <b>150</b>        | <b>nukleär</b>                   | Zwei odere mehrere Mutationen bestimmen den Phänotyp -> aussortiert |
| 152               | zytoplasmatisch                  |   |
| <b>153</b>        | <b>nukleär</b>                   | <i>PRP8</i> -Expression hebt ts-Phänotyp auf                        |
| 154-156           | zytoplasmatisch                  |   |
| <b>157</b>        | <b>nukleär</b>                   | Zwei odere mehrere Mutationen bestimmen den Phänotyp -> aussortiert |
| 158, 159          | zytoplasmatisch                  |   |
| <b>160</b>        | <b>nukleär</b>                   | Zwei odere mehrere Mutationen bestimmen den Phänotyp -> aussortiert |
| 161-164, 178      | zytoplasmatisch                  |   |
| 183-187, 188, 191 | zytoplasmatisch                  |   |
| 193-196, 198      | zytoplasmatisch                  |   |

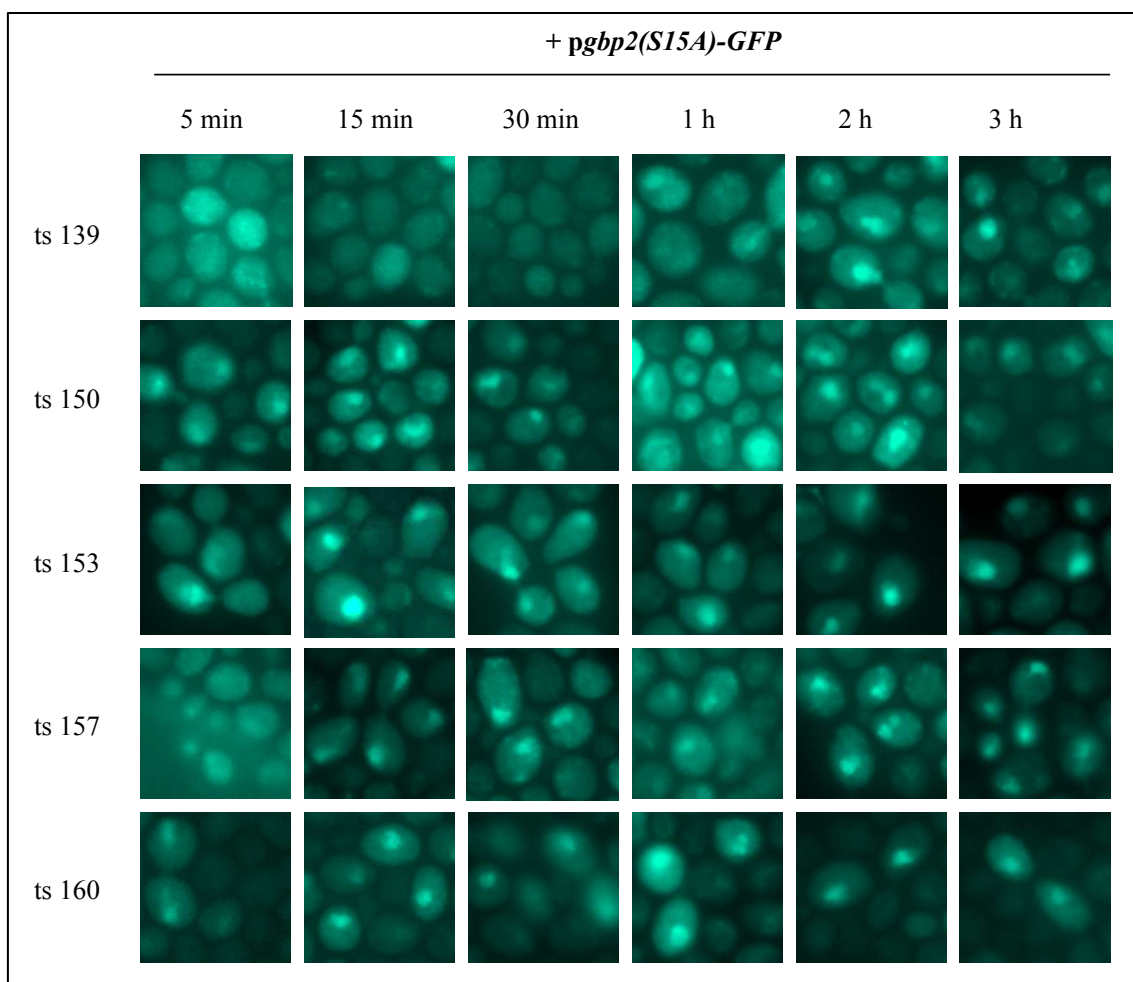
**Tab. 5. Untersuchte ts-Mutanten und die jeweilige Lokalisation von gbp2(S14A)-GFP.** Alle untersuchten Mutanten entstammen der Kollektion von ts-Mutanten die bei der EMS-Mutagenese mit HKY36 + pHK431 (4.3.2 und 4.4) identifiziert worden sind. Ts-Mutanten mit zytoplasmatischem Phänotyp wurden direkt aussortiert.

### 5.2.2.1 Lokalisation von gbp2(S15A)-GFP in den ts-Mutanten

Die einzelnen ts-Mutanten wiesen Unterschiede in ihren spezifischen Phänotypen auf. Um den Phänotyp für jede Mutante genauer bestimmen zu können, wurde die Lokalisation von gbp2(S15A)-GFP nach Inkubation von 5min, 15min, 30 min, 1h, 2h und nach 3h bei nicht-permissiver Temperatur von 37°C durch Fluoreszenzmikroskopie

bestimmt. Der Zeitpunkt, an dem sich der Phänotyp äußerte, und die Stärke der Signale lässt Rückschlüsse darüber zu, in welchem Maß der Defekt in den ts-Stämmen Einfluss auf den Gbp2-Export nimmt.

Für ts139 konnte gezeigt werden, dass erst nach einer Stunde Inkubation bei 37°C vereinzelt Kernsignale zu beobachten sind. Nach zwei und drei Stunden nehmen diese sowohl in Stärke als auch in der Intensität zu. Nach 3h Inkubation bei 37°C weisen etwa 30% der Zellen ein deutliches Kernsignal auf (Abb. 9). Bei ts 160 zeigt sich ein umgekehrtes Bild. Schon bei einer Inkubationszeit von 5min konnte ein deutliches Kernsignal von gbp2(S15A)-GFP detektiert werden, das nach etwa 1h weniger wird. Dabei wurde beobachtet, dass sich vor allem die Zahl der Zellen verringert, die ein Kernsignal aufweisen, nicht aber die Intensität (Abb. 9). Die ts-Mutanten 150, 153 und 157 zeigte bereits nach 5 min eine nukleäre Lokalisation der gbp2-Mutante bei 37°C,



**Abb. 9. Charakterisierung des Phänotyps für die Lokalisation von gbp2(S15A)-GFP.** Fluoreszenzmikroskop-Analyse der Lokalisation von gbp2(S15A)-GFP (pHK431) in den in logarithmischer Phase wachsenden ts-Mutanten 139, 150, 153, 157 und 160 nach Inkubation bei nicht-permissiver Temperatur von 37°C.

wobei Intensität und Zellzahl der Kernsignale mit Dauer der Inkubationszeit zunahmen. Im Vergleich zeigte sich bei ts 153 die höchste Intensität und bei ts 150 die schwächste Intensität des Kernsignals (Abb. 9).

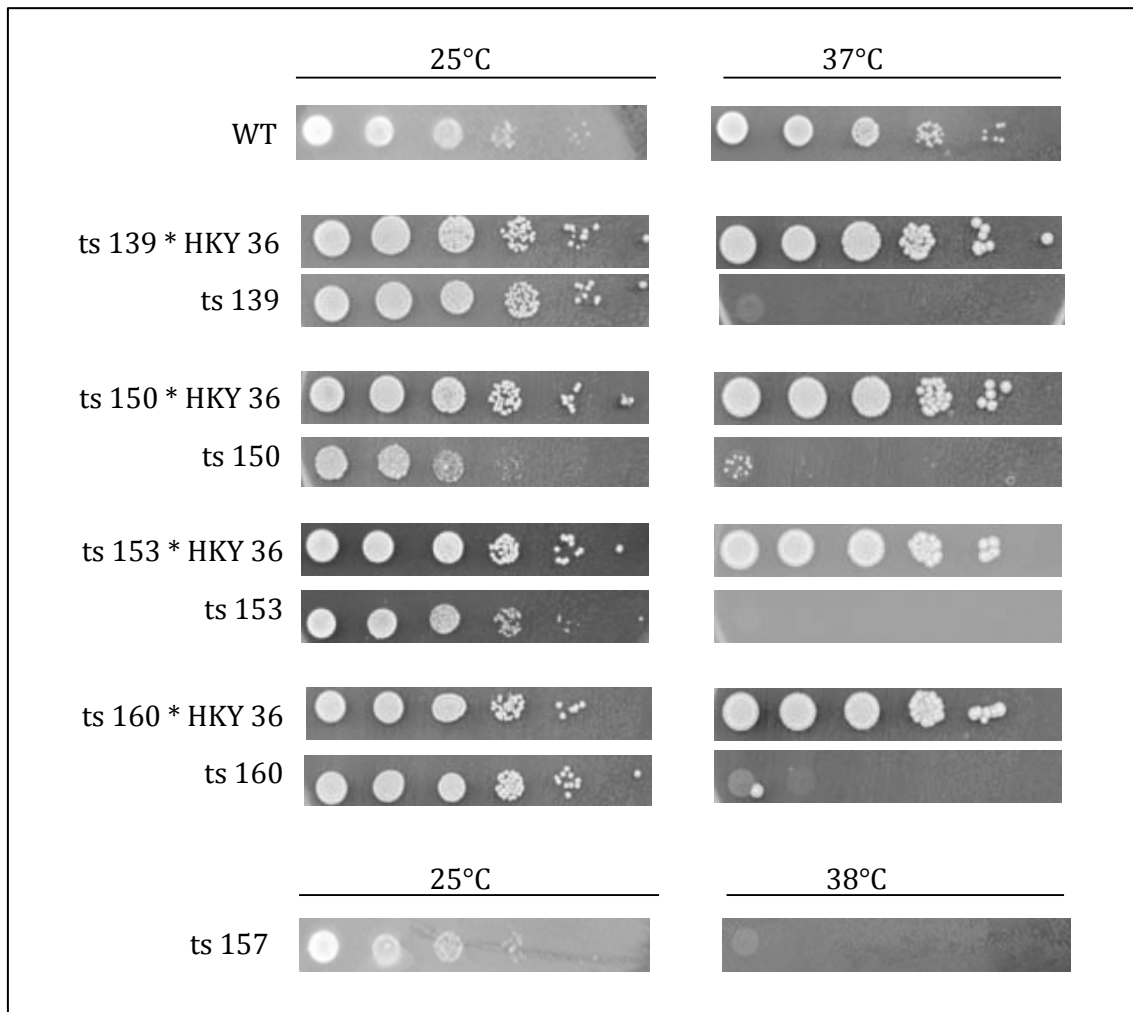
#### **5.2.2.2 Bestimmung der nicht-permissiven Temperatur und Dominanz oder Rezessivität der Mutation**

Für die exakte Bestimmung der nicht-permissiven Temperatur wurden die ts-Mutanten in einer Reihe von 1:10 Verdünnungen von derselben Zellzahl ausgehend auf Agarplatten getropft (Abb. 10). Als Kontrolle wurden Wildtypzellen (HKY 36) mitgeführt. Sollte sich zeigen, dass eine ts-Mutanten bei 37°C noch Wachstum zeigt, wurde die nächsthöhere Temperatur, in diesem Fall 38°C, gewählt. Auf diese Weise konnte für die ts-Mutanten 139, 150, 153 und 160 eine nicht-permissive Temperaturen von 37°C und für ts 157 von 38°C bestimmt werden.

Wird der Phänotyp der einzelnen Mutanten durch eine dominante Mutation hervorgerufen, kann der Defekt nicht durch eine einfache Komplementation identifiziert werden, daher werden nur ts-Mutanten mit rezessivem Gendefekt isoliert. Um die ts-Mutanten dahingehend zu prüfen, wurden die haploiden ts-Mutanten mit Wildtypzellen gekreuzt, so dass diploide Zellen vorlagen. Diese wurden in 1:10 Verdünnungen auf zwei Agarplatten aufgetropft, wobei eine Platte bei 25°C und die andere bei 37°C inkubiert wurde. Liegt bei einer ts-Mutante eine rezessive Mutation vor, wachsen die diploiden Zellen im Gegensatz zu den haploiden bei nicht-permissiver Temperatur, da das Wildtyp-Allel den rezessiven Gendefekt der ts-Mutante komplementieren kann. Wäre die Mutation in der ts-Mutante hingegen dominant, ist sowohl bei 25°C als auch nicht-permissiver Temperatur kein Wachstum zu erwarten. Die Mutationen der ts-Mutanten 139, 150, 153, 15 und 160 sind demnach rezessiv (Abb. 10).

#### **5.2.2.3 Untersuchung auf das Vorliegen einer oder mehrerer Mutationen**

Um den Gendefekt detektieren zu können, ist es wichtig zu wissen, ob eine oder mehrere Mutationen zu dem vorliegenden Phänotyp der ts-Mutanten führten. Um dies zu untersuchen, wurden die ts-Mutanten mit dem isogenen WT (HKY35) gekreuzt, damit diploide Zellen entstehen (4.11.4). Diese wurden dann in Sporulationsmedium überführt. Die diploiden Hefezellen teilen sich in diesem Medium meiotisch, so dass pro diploider Zelle vier haploide Sporen (Tetraden) entstehen. Mit dem Dissektionsmikroskop wurden die Sporen der Tetraden getrennt und anschließend auf



**Abb. 10. Bestimmung von nicht-permissiver Temperatur und Dominanz oder Rezessivität der Mutation.** Für die Erzeugung von diploiden Stämmen wurde die TS-Mutanten mit Wildtyp (HKY35) gekreuzt, eine Nacht auf einer Vollmedium-Agarplatte bei 25°C inkubiert und dann auf Selektionsplatten übertragen (4.11.4) Alle Zellen wurden von derselben Zellzahl ausgehend auf eine Vollmediumplatte aufgetropft und bei 25°C und 37°C bzw. 38°C inkubiert.

ihre genetischen Marker für bestimmte Aminosäuren untersucht. Diese sollten sich nach den Mendel'schen Regel in einem Verhältnis von 2:2 aufteilen. Des Weiteren wurde das Verhalten der Temperatursensitivität und die Kernlokalisierung von gbp2(S15A)-GFP in den einzelnen Sporen getestet. Sollten sich diese nicht auch im Verhältnis von 2:2 aufteilen, war davon auszugehen, dass zwei oder mehrere Veränderungen des Genoms zu dem in der jeweiligen ts-Mutante vorliegenden Phänotyp führten. Unter dem Verhältnis von 2:2 versteht man in diesem Zusammenhang, dass die zwei Sporen, die einen ts-Phänotyp aufweisen auch eine Kernlokalisierung von gbp2(S15A)-GFP zeigten. Dieses wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie (4.11.3) bestimmt. Da es hierbei zunächst nur um die Frage einer möglichen Kernlokalisierung ging, wurden die ts-Mutanten vor der Fluoreszenzmikroskopie für 30 min und 3h bei der jeweiligen nicht-permissiven

Temperatur inkubiert. Zeigte sich ein Verhältnis von 2:2, war dies ein Hinweis, dass möglicherweise nur eine Mutation beide phänotypischen Veränderungen bedingt.

Bevor dann versucht wurde durch Transformation der Plasmidbibliothek den verursachenden Gendefekt zu identifizieren, wurden solche Mutanten noch ein zweites oder drittes Mal mit ihrem isogenen WT rückgekreuzt, da trotz eines 2:2 Verhältnisses zwei oder mehrere Mutationen vorliegen konnten. Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelne ts-Mutanten vorgestellt.

Nach der ersten Kreuzung von ts 157 mit WT-Hefezellen wurden sechs Tetraden auf ihre Verteilung der genetischen Marker und Temperatursensitivität untersucht. Wie bei allen anderen ts-Mutanten geschah dies durch Überprüfung des Wachstums auf verschiedenen Nährstoffmangelmedien bei der vorher bestimmten sensitiven Temperatur. Für TS157 war das 38°C. Sechs Tetraden zeigten hier sowohl für die genetischen Marker (Aminosäuren) als auch für die Temperatursensitivität eine 2:2 Verteilung. Für zwei dieser Tetraden wurde mit Fluoreszenzmikroskopie die Lokalisation von gbp2(S15A)-GFP bestimmt. Hier zeigte sich, dass die Sporen, die einen temperatursensitiven Phänotyp aufwiesen, auch eine nukleäre Lokalisation von gbp2(S15A)-GFP hatten, allerdings zeigten sich für die Sporen leichte Unterschiede in der Intensität und Anzahl der Kernsignale. Die Spore 2d dann wurde für eine zweite Kreuzung mit WT-Zellen verwendet, da sie sehr deutliche Kernsignale, in etwa 50% der Zellen aufwies. Nach Untersuchung von Tetraden dieser zweiten Kreuzung deutete alles darauf hin, dass bei ts 157 mehrere Mutation zu dem Phänotyp von gbp2(S15A) führten. Es konnte keine Übereinstimmung von Temperatursensitivität und Kernlokalisation festgestellt werden. Die Sporen 1a, 1c, 4c und 4d waren bei 38°C nicht lebensfähig. Eine Kernlokalisation von gbp2(S15A) hingegen zeigten die Sporen 1a, 1b, 1c, 4a und 4b. Dies bedeutete, dass unterschiedliche Mutationen den jeweiligen Phänotyp bestimmten. Des Weiteren nahm die Intensität der Kernsignale und die Anzahl dieser Signal im Vergleich zu den untersuchten Tetraden der ersten Kreuzung deutlich ab. Nur noch in etwa 5-10% der Zellen zeigte sich ein Kernsignal von sehr schwacher Intensität. Aus diesem Grund wurde die ts 157 an dieser Stelle verworfen.

Ein ähnliches Muster führte dazu, dass auch ts 160 aussortiert wurde. Nach der ersten Kreuzung zeigte sich in den Tetraden 3 und 5, dass die Sporen, die bei 37°C temperatursensitiv waren auch gbp2(S15A)-GFP mislokalisierten. Nach der zweiten Kreuzung von Sporen 5d mit isogenem WT zeigten sich die Phänotypen Temperatursensitivität und Zellkernlokalisation von gbp2(S15A)-GFP allerdings nicht

mehr in denselben Sporen einer Tetradenkollektion. Für Tetrade 1 z. B. zeigte sich eine Kernlokalisierung von gbp2(S15A)-GFP nur in Spore 1d, die Sporen 1c und 1d hingegen waren bei 37°C temperatursensitiv. Da auch andere Tetraden der zweiten Kreuzung ähnliche Verteilungsmuster der Phänotypen aufwiesen, wurde diese ts-Mutante ebenfalls aussortiert.

Bei ts 150 zeigte sich schon nach erster Kreuzung ein Verteilungsmuster der Phänotypen, das auf das Vorliegen unterschiedlicher zugrundeliegender Mutationen hinweist. Die vier untersuchten Tetraden zeigten sowohl für Temperatursensitivität als auch für Kernlokalisierung von gbp2(S15A)-GFP eine 2:2 Verteilung, jedoch waren diese nicht in denselben Sporen einer Tetrade zu beobachten. Für die Spore 1c konnte ein besonders deutliches Kernsignal in mehr als 50% der Zellen beobachtet werden. Es wurde vermutet, dass hier möglicherweise ein entscheidender Faktor des mRNA-Exportes bzw. Gbp2-abhängigen mRNA-Exportes defekt war. Daher wurde der Versuch unternommen, diese Spore mit ihrem isogenen WT rückzukreuzen. Ziel sollte sein, dadurch möglicherweise die verschiedenen Mutationen zu trennen und dann zu untersuchen, ob der Phänotyp immer noch so stark darzustellen war. Doch auch nach der zweiten Kreuzung zeigte sich nicht die gewünschte Verteilung der Phänotypen, sodass auch diese Mutante schließlich aussortiert wurde.

Für ts 153 zeigte sich nach der ersten Kreuzung keine 2:2 Verteilung hinsichtlich der beiden phänotypischen Merkmale. Es lagen also zwei oder mehrere Mutationen vor. Auch bei dieser ts-Mutante wurde versucht, durch erneutes Kreuzen mit WT-Zellen die Mutationen zu trennen. Spore 1c, die ähnlich wie ts 150, ein sehr deutliches, nukleäres Signal für gbp2(S14A)-GFP in 50-60% der Zellen zeigte, wurde mit den isogenen WT gekreuzt. Aus dieser Kreuzung wurden sechs Tetraden gewonnen, deren Sporen alle eine 2:2 Verteilung für die genetischen Marker und die Temperatursensitivität aufwiesen. Die Tetraden 2 und 4 wurden auf ihre Lokalisation von gbp2(S15A)-GFP untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Sporen 2b, 2d, 4b und 4d sowohl temperatursensitiv waren als auch eine Zellkernlokalisierung von gbp2(S15A)-GFP hatten. Allerdings wurde beobachtet, dass sich die Kernlokalisierung erst nach etwa einer Stunde einstellte. Um sicher zu gehen, dass nach der zweiten Kreuzung tatsächlich eine einzelne Mutation zu beiden Phänotypen führte, wurde nochmals mit WT rückgekreuzt. Dazu wurde Spore 4b verwendet. In der Charakterisierung der Tetraden zeigte sich auch nach dieser Kreuzung, dass die untersuchten Sporen der Tetraden 1, 2 und 5 die gewünschte Verteilung des Phänotypes aufwiesen. Genau wie bei den Sporen der

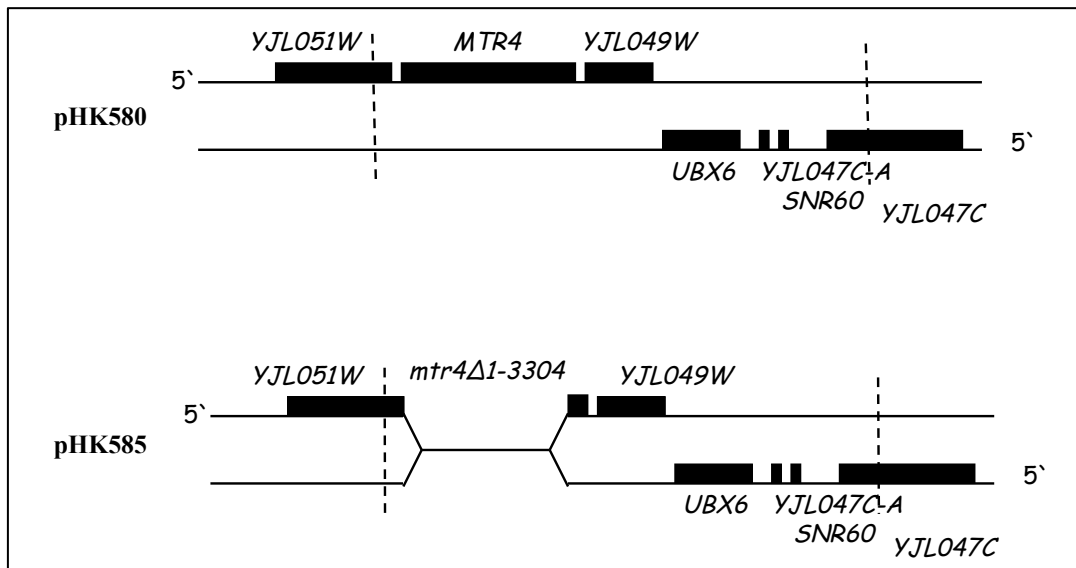
zweiten Kreuzung, zeigte sich die Kernlokalisierung jedoch erst nach 1-3 Stunden. Bei der Tetrade 1 waren Sporen 1a und 1b temperatursensitiv und lokalisierten gbp2(S15A)p-GFP zu 50-60 % der Zellen im Zellkern. Die Spore 1a wurde für die Transformation mit der genomischen Plasmidbank verwendet.

Nach der Kreuzung von ts 139 mit dem isogenen WT (HKY35) deutete die Untersuchung der Tetraden 1 und 2 daraufhin, dass hier eine einzelne Mutation den Phänotyp bestimmte. Die Sporen 1a, 1d, 2c und 2d zeigten kein Wachstum bei der vorher bestimmten nicht-permissiven Temperatur von 37°C und lokalisierten gbp2(S15A)-GFP im Kern. Diese Lokalisation zeigte sich, wie schon bei der ts-Mutante selbst (Abb. 9) erst ab einer Stunde. Um sicherzustellen, dass eine Einzelmutation vorlag, wurde ein weiteres Mal rückgekreuzt und Spore 1a mit ihrem isogenen WT gekreuzt. Auch die Tetradencharakterisierung dieser zweiten Kreuzung wies das gewünschte 2:2 Verhältnis der Phänotypen auf. Spore 6c der zweiten Kreuzung wurde für den Versuch zur Detektion des Gendefektes weiter verwendet.

### 5.2.3 Identifikation des mutierten Faktors

Zur Identifizierung wurde die genomische Plasmidbank von Rose et al. verwendet (Rose et al., 1987). Diese enthält 14 verschiedene „Plasmidpools“, die im Mittel jeweils zwei- bis dreimal das Genom von *S. cerevisiae* enthalten. Die verschiedenen „Genpools“ unterscheiden sich in der Größe der Fragmente genomischer DNA und in der Anzahl der Plasmide. Zunächst wurde mit dem „Genpool A“ angefangen, da dieser im Vergleich zu den Banken „B“ und „C“ kleinere DNA-Fragmente enthält, was die Zahl möglicher in Frage kommender Gene einschränkt, aber weniger Subklonierungen nach sich zieht (Rose et al., 1987). Um sicher zu stellen, dass alle Plasmide eines „Pools“ durchsucht wurden, wurde die dreifache Komplexität gescreent.

Als erstes erfolgte die Selektion auf Temperatursensitivität: Nach der Transformation wurden die Selektionsplatten zunächst für eine Nacht bei 25°C inkubiert, um eine Expression der kodierenden Gene zu erlauben, anschließend wurden die Platten in einen 37°C-Inkubator überführt. Bei 37°C sollten nur solche transformierten ts-Zellen wachsen, deren Temperatursensitivität durch Vorhandensein des entsprechenden Wildtyp-Gens aufgehoben wurde. Zeigte sich, dass Kolonien bei nicht-permissiver Temperatur wuchsen, wurden aus diesen das Plasmid isoliert, in *E. coli* vermehrt und die ts-Mutante erneut mit diesem Plasmid transformiert, um zu überprüfen, ob das



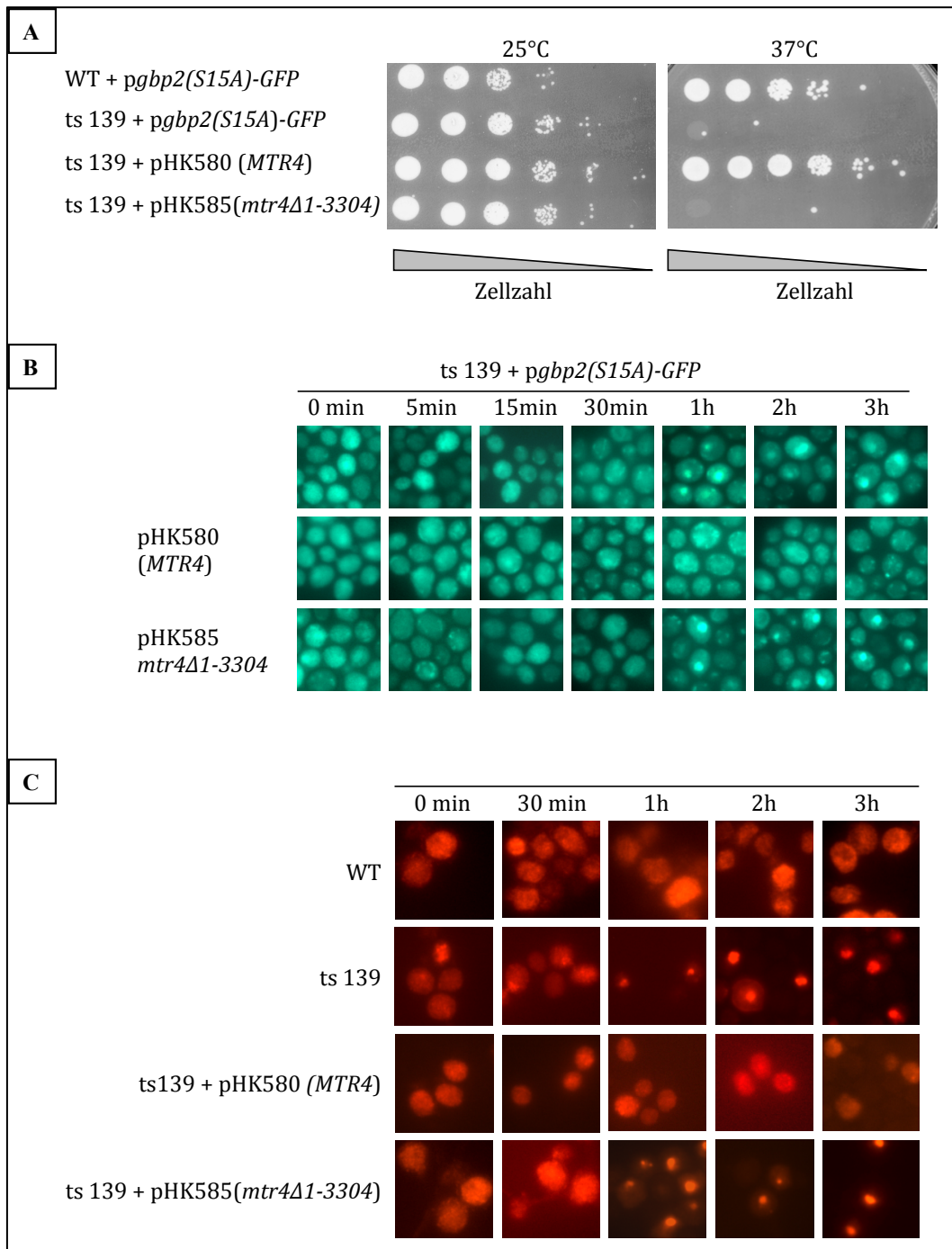
**Abb. 11.** Schematische Darstellung des durch Sequenzierung identifizierten, aus *S. cerevisiae* stammenden DNA-Fragmentes auf Chromosom X in pHK580 und der Subklonierung mit *mtr4Δ1-3304*, pHK585. Dargestellt ist Chromosom X, Basenpaare 340000 – 350000. Die Sequenz zwischen den gestrichelten Linien stellt das identifizierte DNA-Fragment in pHK580 dar. In pHK585 wurde die Deletion *mtr4Δ1-3304* eingeführt.

Plasmid tatsächlich in der Lage war den temperatursensitiven Phänotyp und die in den Mutanten veränderte Lokalisation von gbp2(S15A)-GFP aufzuheben.

### 5.2.3.1 Eine Mutation in *MRT4* ist für den Phänotyp von ts 139 verantwortlich

Für die Identifizierung der zugrundeliegenden Mutation in ts 139 wurde die Spore 6c (= HKY428, zweite Kreuzung ts 139 mit HKY35, 5.2.3) mit der Plasmidbank wie oben beschrieben transformiert. Aus der bei 37°C wachsenden Kolonien wurde das Plasmid pHK580 isoliert. Die Sequenzierung von pHK580 ergab das als DNA-Fragment in Abb. 11 angegebenen Bereich. Abb. 12 zeigt, dass pHK580 sowohl die Temperatursensitivität (Abb 12A) als auch die Kernlokalisierung von gbp2(S15A) (Abb 12B) in ts 139 (HKY428) aufhob. Des Weiteren wurde mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung poly(A)<sup>+</sup>-RNA in den Zellen lokalisiert. Für WT-Zellen (HKY36 plus gbp2(S15A)-GFP, pHK431) ist mRNA in der gesamten Zelle zu sehen und in ts 139 (HKY428) wie erwartet hauptsächlich im Zellkern. Die Transformation von ts 139 mit pHK580 führte zu einer zytoplasmatischen Lokalisation von mRNA wie im Wildtyp (Abb. 12C). Die Expression der Gene auf dem DNA-Fragment in pHK580 führte offensichtlich dazu, den durch EMS-Mutagenese hervorgerufenen Gbp2-assoziierten mRNA-Export Defekt von ts139 aufzuheben. Von den möglichen Genen *MTR4*, *YJL049W*, *UBX6*, *YJL047C-A* und *SNR60* (Abb. 11) erscheint *MTR4*, dessen Genprodukt eine RNA-Helikase ist und von dem ist bereits bekannt ist, dass es für den



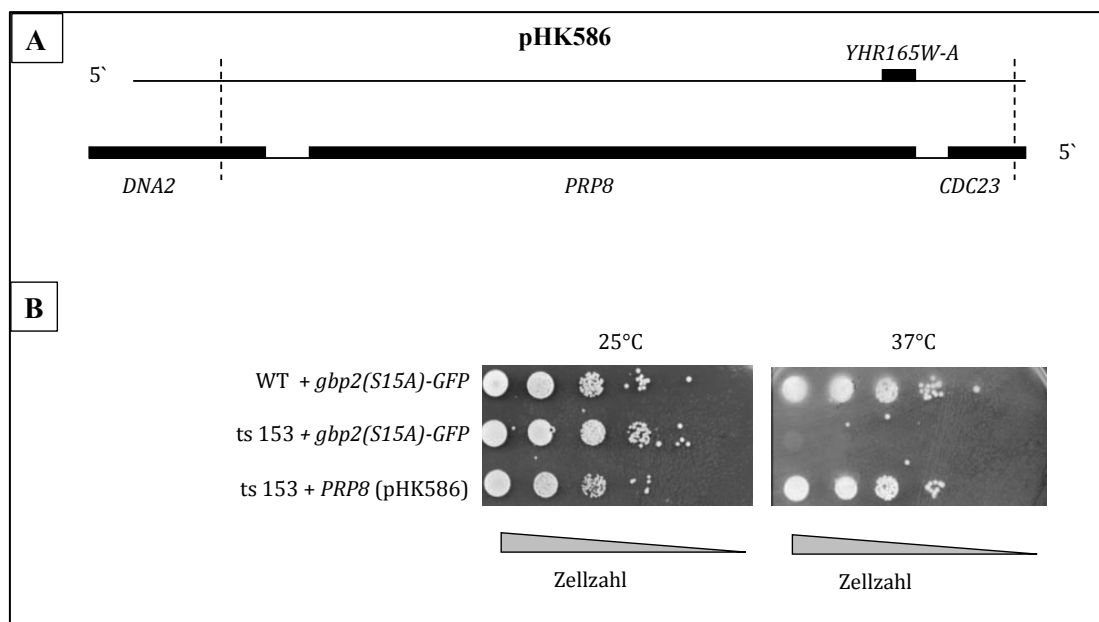


**Abb.12. *MTR4* ist für den spezifischen Phänotyp in ts 139 (HKY428) verantwortlich.** A: Die ts-Mutante 139 (Spore 6c, zweite Kreuzung) wurde mit den Konstrukten pHK580 (*MTR4*, *YJL049w*, *YJL048c*) und pHK585 (*mtr4Δ1-3304*, *YJL049w*, *YJL048c*) transformiert. Als Negativkontrolle dienten ts 139 (HKY428) mit *gpbp2(S15A)*-GFP (pHK431) transformierte Zellen. Positivkontrolle waren Wildtyp-Zellen (HKY36) mit *gpbp2(S15A)*-GFP. Alle Stämme wurden von derselben Zellzahl ausgehend in 1:10 Verdünnungen auf 2 Selektionsplatten aufgetropft, von denen eine bei 25°C und die andere bei 37°C inkubiert wurde. B: ***Mtr4* hebt die Kernlokalisierung von *gpbp2(S15A)* in ts 139 auf.** ts 139 (Spore 5b, zweite Kreuzung) wurde mit *gpbp2(S15A)*-GFP (pHK431) transformiert, zusätzlich wurde das identifizierte Plasmid pHK580 (*MTR4*, *YJL049w*, *YJL048c*) bzw. pHK585 (*mtr4Δ1-3304*, *YJL049w*, *YJL048c*) kotransformiert. Die Analyse von *gpbp2(S15A)*-GFP erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Dazu wurden die Zellen bei 25°C bis zur logarithmischen Phase angezogen und anschließend bei nicht-permissiver Temperatur (37°C) für die jeweils angegebenen Zeiten inkubiert. C: ***Mtr4* hebt den mRNA-Export-Defekt von ts 139 auf.** Die intrazelluläre Lokalisation von poly(A)<sup>+</sup>-RNA wurde mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit einer Cyanin3 markierten oligo-dT<sub>50</sub>-Sonde detektiert. Dazu wurden die Zellen wie unter B angezogen und entsprechend bei 37°C inkubiert.

mRNA-Export benötigt wird, am wahrscheinlichsten (de la Cruz et al., 1998; Liang et al., 1996b). Um zu testen, ob *MTR4* für die Aufhebung des Phänotyps verantwortlich war, wurde eine *mtr4Δ1-3304*-Deletionsmutante erstellt (pHK585, Abb. 12). Ts 139 wurde dann mit dieser Deletionsmutante transformiert. Abb. 12A und 12B zeigten eine erneute Temperatursensitivität und eine Mislokalisierung von *gbp2(S15A)*, wenn *mtr4* nicht exprimiert werden kann. Auch der mRNA-Export-Defekt von ts 139 stellte sich wieder ein, was daran zu sehen ist, dass mRNA wieder im Zellkern akkumuliert (Abb. 12C). Dies bestätigt, dass in ts 139 ein Defekt von *MTR4* vorliegt, der zu einer mRNA-Akkumulation im Zellkern führt.

### 5.2.3.2 *PRP8* wird als mutiertes Gen in ts 153 identifiziert.

Nach Transformation von ts 153 mit der „Plasmidpools“ A1-A6, B1-B3 und C1-3 zeigte sich kein Wachstum auf den Transformationsplatten nach Inkubation von 3-4 Tagen bei 37°C. Erst nach Transformation des „Plasmidpools“ C4 konnte ein Wachstum von Kolonien bei 37°C beobachtet werden. Aus den gewachsenen Kolonien wurden die Plasmide isoliert und durch Restriktionsanalysen wurde ermittelt, dass es sich um einen Typ handelte. Ts 153 wurde mit diesem Plasmid (pHK586, Abb. 13A) transformiert und überprüft, ob dieses die Temperatursensitivität aufhob. Wie Abb. 13B



**Abb. 13. Defektes *PRP8* ist für den temperatursensitiven Defekt in ts 153 verantwortlich.**

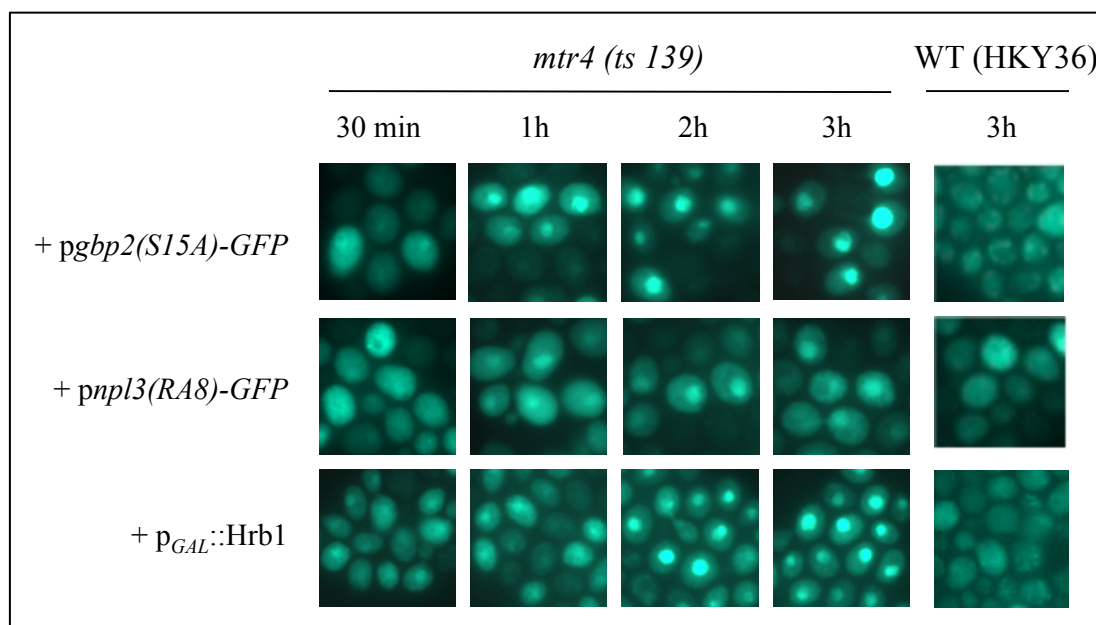
A. Schematische Darstellung des identifizierten DNA-Fragments auf Chromosom VIII, 427577 bp – 437980 bp. B. Wildtyp-Zellen (HKY36) wurden mit dem Konstrukt pHK431 (*gbp2(S15A)-GFP*), ts 153 (Spore 1a, dritte Kreuzung) wurde mit *gbp2(S15A)-GFP* (pHK431) bzw. pHK586 (*PRP8*) transformiert. Die Zellen wurden von gleicher Zellzahl ausgehend in einer 1:10 Verdünnungsreihe auf zwei Selektionsplatten aufgetropft und bei 25°C und 37°C über 3 Tage inkubiert.

zeigt wird durch das Plasmid pHK586 dieser Phänotyp von ts 153 aufgehoben: die mit pHK586 transformierte ts-Mutante wächst sowohl bei 25°C als auch bei 37°C.

#### 5.2.4 Die *mtr4*-Mutation in pHK585 führt zu nukleären Lokalisation der zytoplasmatischen Versionen der SR-Proteine Gbp2, Npl3 und Hrb1.

Um den Einfluss der identifizierten *mtr4*-Mutation auf die verschiedenen SR-Proteine zu testen, wurden jeweils zytoplasmatische, mit GFP-fusionierte Varianten dieser Proteine verwendet. Für Hrb1 konnte gezeigt werden, dass es durch Überexpression unter dem induzierbaren *GALI*-Promoter vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert ist ( $P_{GALI}:HRB1-GFP$ , pHK235) (Hacker und Krebber, 2004). Die Punktmutation in der SR-Domäne von Npl3-RA8 ( $GFP-npl3(RA8)$ , pHK419) führte ebenfalls zu einer vorwiegend zytoplasmatischen Lokalisation (Gilbert et al., 2001). Als zytoplasmatische Gbp2-Varianten wurde das Plasmid pHK571 ( $P_{GBP2}:GBP2(S15A)-GFP$ ) verwendet. Dieses Plasmid enthält eine  $2\mu$ -Sequenz, die bewirkt, dass das Plasmid in 30-50-fach höherer Kopienzahl vorliegt als vergleichsweise bei einer Zentrosomsequenz (*CEN*, z.B. bei pHK431)(Clarke und Carbon, 1980).

Ts 139 wurde mit den Konstrukten transformiert. Zur Expression von Hrb1-GFP wurde der *GALI*-Promoter wie unter 4.9.2 beschrieben induziert und anschließend für eine Stunde mit Glukose reprimiert, um eine Verfälschung der Lokalisation durch Neu-



**Abb. 14. Die *mtr4* Mutation in pHK595 führt zu Exportdefekten in Gbp2, Hrb1 und Npl3.** Ts 139 wurde mit *gbp2(S15A)GFP* (pHK571,  $2\mu$ ), *npl3(RA8)GFP* (pHK419) und  $P_{GALI}:HRB1-GFP$  (pHK235) transformiert. Die Zellen wurden bis zur logarithmischen Phase bei 25°C angezogen, danach für die angegebenen Zeiten bei 37°C inkubiert. Die Lokalisation der GFP-Fusionsproteine wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert.

synthese zu verhindern. Alle Zellen wurden dann einer Inkubation bei 37°C ausgesetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben für Fluoreszenzmikroskopie entnommen. Für gbp2(S15)A (pHK571, 2 $\mu$ ) stellte sich ab einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C eine nukleäre Lokalisation von gbp2(S15)A in fast allen Zellen ein (Abb. 14). Anders als bei den Untersuchungen mit dem *CEN*-Plasmid (pHK431) war, die Intensität des Signal wie zu erwarten verstärkt (Abb. 14).

Für npl3(RA8) zeigten sich nach einer Stunde sehr schwache Kernsignale in etwa 10-20% der Zellen. Nach 2 Stunden wurden diese deutlicher, allerdings erreichen sie auch nach 3h nicht an die Intensität heran, die für gbp2(S15A) in ts 139 beobachtet werden konnte. Ebenso ist auch die Anzahl der Zellen, die nach 3h Inkubation bei 37°C eine Kernlokalisation für npl3-RA8 zeigten, mit 10-20% wesentlich geringer (Abb. 14).

*GAL1*:Hrb1 zeigte nach 2h eine Änderung der Lokalisation von Hrb1 in den Kern in fast allen Zellen und eine Intensität wie gbp2(S15A)(2 $\mu$ ) (Abb. 14).

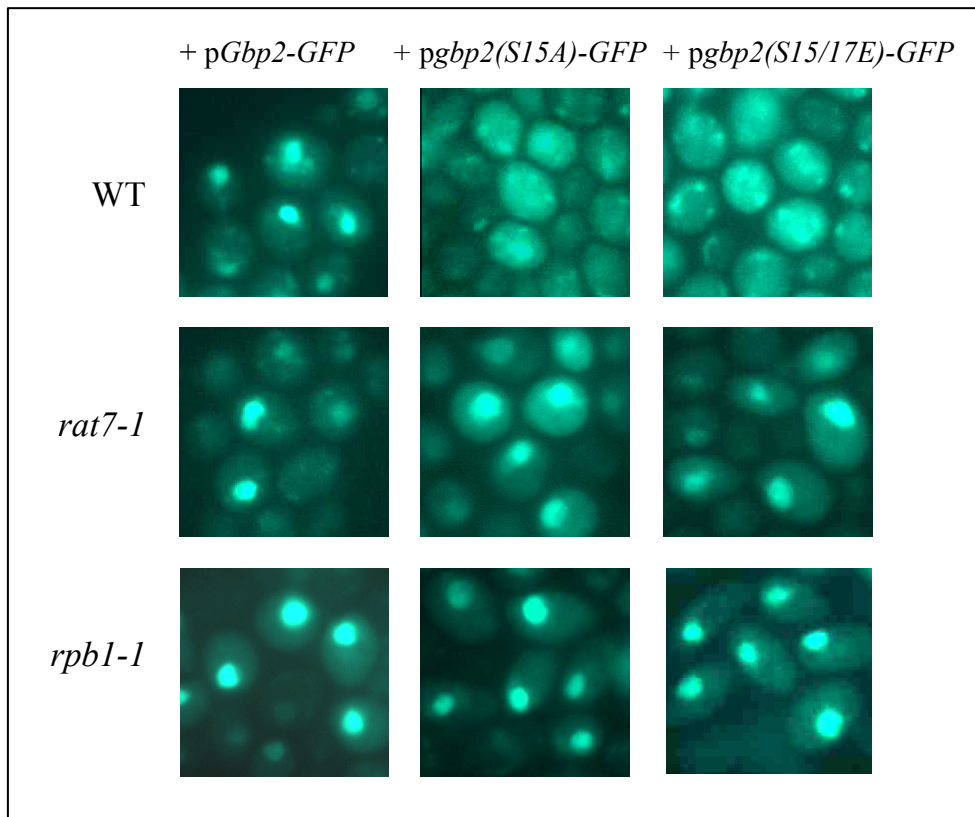
Für alle drei SR-Proteine konnte gezeigt werden, dass eine Mutation von *mtr4* den Export der Proteine beeinflusst. Die unterschiedliche Intensität der Signale von Hrb1 und Gbp2 zu Npl3 könnten auf unterschiedliche Expressionsspiegel zurückzuführen sein oder darauf, dass Gbp2 und Hrb1 im Gegensatz zu Npl3 auf unterschiedliche Weise mit Mtr4 interagieren.

### 5.3 Die Toxizität von Gbp2 in Überexpression ist nicht auf ein Zellkompartiment beschränkt.

Die Überexpression von *GBP2* ist toxisch für Hefezellen und führt zu einer Retention von mRNA im Zellkern (Windgassen und Krebber, 2003): Nach Induktion von  $P_{GAL1}:GBP2-GFP$  zeigten Zellen, die im Vergleich zu Zellen, die ein NLS-GFP von dem induzierbaren *GAL1*-Promoter exprimierten, einen deutlichen Wachstumsdefekt. Mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung wurde gezeigt, dass mRNA in Gbp2-überexprimierenden Zellen vermehrt im Zellkern lokalisiert ist. Hohe Mengen an Gbp2 führten also offensichtlich zu einem mRNA-Export-Defekt (Windgassen und Krebber, 2003). Zusätzlich konnten gezeigt werden, dass dieser Effekt nicht auf einer Verschiebung des Lokalisationsgleichgewichtes beruhte, da Gbp2 in Überexpression genau wie Gbp2 in physiologischen Konzentration hauptsächlich im Zellkern lokalisiert war. Des Weiteren war in Zellen, die ein NLS-GFP überexprimierten, dieses zwar ebenfalls hauptsächlich im Zellkern lokalisiert, führte aber nicht zu einem mRNA-Export-Defekt. Windgassen und Krebber folgerten daraus, dass die Konzentration von Gbp2 entscheidend ist (Windgassen und Krebber, 2003). Der Grund für die Toxizität sollte weiter untersucht werden, da hierdurch neue Erkenntnisse über die Funktion von Gbp2 zu gewinnen sind.

Zunächst sollte dabei der Effekt verschiedener Mutanten in Überexpression auf die Hefezelle untersucht werden. Es wurde eine phosphomimetische Mutante hergestellt, in der die Serinreste 15 und 17 zu Glutaminsäure (E) mittels „site-directed-mutagenesis“ ausgetauscht wurden (pHK525,  $P_{GBP2}:GBP2-S15/17E-GFP$ , 4.10.13). Um die Lokalisation dieser Mutante zu bestimmen, wurden Wildtypzellen (HKY36) transformiert (2.11.2). Der transformierten Stamm wurden dann bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C angezogen und die Lokalisation der Mutante mit Fluoreszenzmikroskopie (2.11.3) bestimmt. Abb. 15 zeigt eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation für gbp2(S15/17E)-GFP. Die phosphomimetische Mutante, die durch den Austausch von Serin zu Glutaminsäure an S15/17 eine dauerhafte Phosphorylierung vortäuscht, zeigte wider Erwarten einen Importdefekt.

Um zu zeigen, ob gbp2(S15/17E) ähnlich wie Gbp2 in Abhängigkeit von mRNA aus dem Kern exportiert wird, wurden die veränderten Stämme *rat7-1* (HKY124) und *rpb1-1* (HKY319) mit pHK525 ( $P_{GBP2}:GBP2-S15/17E-GFP$ ) transformiert. gbp2(S15/17E)

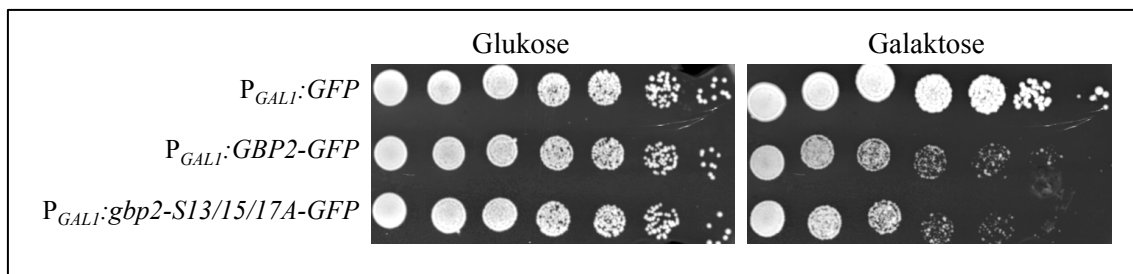


**Abb. 15. Die phosphomimetische Mutante (gbp2/S15/17E) hat einen Importdefekt:** Wildtypzellen (HKY36), *rat7-1* (HKY124) und *rpb1-1* (HKY319) wurden mit den *CEN*-Plasmide pHK367 ( $P_{GBP2}:GFP$ ), pHK431 ( $P_{GBP2}:gbp2(S15A)$ ) und pHK525 ( $P_{GBP2}:gbp2(S15/17E)$ ) transformiert. Die Zellen wurden bei 25°C bis zur logarithmischen Phase angezogen. Die transformierten Wildtyp-Zellen wurden dann direkt fixiert. Die transformierten Stämme *rat7-1* und *rpb1-1* wurden unmittelbar vor der Fixierung für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Detektion des GFP-Signals erfolgte mit Fluoreszenzmikroskopie.

zeigte in diesem Mutanten eine stark nukleäre Lokalisation, ähnlich wie Gbp2 und gbp2(S15A) (Windgassen und Krebber, 2003). Das bedeutet, das Fehlen von mRNA und/oder wichtigen Exportfaktoren führt dazu, dass gbp2(S15/17E) scheinbar nicht oder nur sehr viel langsamer aus dem Kern exportiert wird.

Für die gbp2(S13/15/17A)-Mutante ist bekannt, dass sie im Gegensatz zu Gbp2 hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist. In „UV-Crosslinking“-Experimenten konnte gezeigt werden, dass diese A-Mutante verstärkt an mRNA-bindet (Windgassen und Krebber, 2003). Als Grund dafür wurde die Blockierung der Phosphorylierung durch die Kinase Sky1 vermutet. (Windgassen und Krebber, 2003; Windgassen et al., 2004). Um den Effekt von gbp2(S13/15/17A)-GFP in Überexpressionsstudien zu untersuchen, wurde *GBP2* zunächst unter Kontrolle des *GALI*-Promoter kloniert (pHK475). Für einen Wachstumsvergleich wurden die mit pHK475 transformierten Wildtypzellen in raffinosehaltigem Medium angezogen, in abnehmender Verdünnung auf eine Glukose- und eine Galaktose-Selektionsplatte aufgetropft und bei 25°C

inkubiert. Zur Kontrolle wurde mit pHK422 ( $P_{GALI}:GBP2-GFP$ ) und mit pHK231 ( $P_{GALI}:GFP$ ) transformierte Wildtypzellen mitgeführt. Für  $P_{GALI}:GBP2-GFP$  konnte das Ergebnis von Windgassen und Krebber, 2003 bestätigt werden und für  $P_{GALI}:GBP2-S13/15/17A-GFP$  zeigte sich, dass diese Mutante in Überexpression das Wachstum ebenso hemmt wie das des Wildtyps (Abb. 16). Es ist bekannt, dass  $gbp2(S13/15/17A)$  in Überexpression eine zytoplasmatische Lokalisation hat (Windgassen und Krebber, 2003). Die Toxizität von Gbp2 in Überexpression scheint also nicht auf eine nukleäre Lokalisation beschränkt zu sein.



**Abb. 16. Die Toxizität von Gbp2 ist nicht auf die nukleäre Lokalisation beschränkt.** Wildtypzellen, die GFP (pHK231), Gbp2-GFP (pHK422) und  $gbp2(S13/15/17)-GFP$  (pHK475) unter Kontrolle des *GALI*-Promoters exprimieren. Die Zellen wurden in raffinosehaltigem Medium bei 25°C angezogen. Von gleichen Zellzahlen ausgehend wurden 1:10-Verdünnungen auf eine Glukose- und eine Galaktose-Agarplatte aufgetropft und bei 25°C inkubiert.

## 5.4 Expression von Hrb1 und Hrb1-S46A

Wie bei den beiden anderen SR-Proteinen, Npl3 und Gbp2, wird auch für Hrb1 vermutet, dass die SR/RGG-Domäne und die Phosphorylierung durch die einzige SR-Protein spezifische Kinase (SRPK) in *S. cerevisiae*, Sky1 entscheidend für den Import in den Zellkern ist. S46 als mögliche Phosphorylierungsstelle konnte bereits ausgeschlossen werden (Häcker, 2003). Es ist bekannt, dass die humane SRPK2 besonders für Arginin, Histidin, Glutaminsäure und Prolin selektioniert, während Lysin, Glycin und Phenylalanin eher ungünstige Angriffsstellen für SRPK2 darstellen (Yun und Fu, 2000). Basierend hierauf wäre eine weitere potentielle Sequenz für eine Phosphorylierung durch Sky1 bei S62. Bevor dies durch weitere Austauschmutanten überprüft wird, soll zunächst mittels eines in vitro-Kinase-Versuchs untersucht werden, ob Hrb1 überhaupt von Sky1 phosphoryliert wird. Das dazu benötigte, aufgereinigte Protein soll außerdem dazu genutzt werden, spezifische Antikörper herzustellen.

Es wurde zunächst versucht eine stabile Expression und Aufreinigung zu etablieren, dazu wurden *HRB1* und *hrb1(S46A)* zunächst in den Vektor pQE 60 kloniert (pHK560 und pHK561, 4.10.13.). Dadurch werden beiden Proteinen bei Expression carboxyterminal sechs Histidine angehängt, die Affinitätschromatographie zur Aufreinigung erfolgte dann über Ni-NTA-Säulen (4.13). In diesem Vektor stehen die Gene unter Kontrolle des T5-Promoters des T5 Bakteriophagen. Er wird durch ein doppeltes *lac*-Operons reguliert. Um die Transkription der Gene zu blockieren, wird der *lac* Repressor *lacI* benötigt, der an das *lac*-Operon bindet. Zur Klonierung wurde der *E. coli*-Stamm Top10F' (4.3.1.) verwendet, der die Mutation *laqI<sup>q</sup>* aufweist, dadurch sollte eine genügend hohe Menge an *laqI* vorhanden sein, um eine frühzeitige Expression der Proteine zu verhindern. Zur Expression wurde dann der *E. coli*-Stamm *MI5[pREP4]* transformiert. Das vorhandene Plasmid exprimiert eine noch höhere Menge an *lacI*, was eine frühzeitige Expression noch vor der Induktion effizienter verhindern soll (Qiagen, 2001).

Für Testexpressionen beider Proteine nach Induktion mit IPTG für vier Stunden, wurden die Zellen lysiert (4.13.2) und die Proteine über eine Ni-NTA Affinitätschromatographie aufgereingt (4.13.3). Die Lysate und Eluate wurden nach der Aufreinigung einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (4.12.1) unterzogen und die Proteine mit Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (4.12.2). Nach mehreren Wiederholungen von Expression, Lyse der Bakterienzellen unter nativen und denaturierenden Bedingungen und Aufreinigung konnten sowohl in den Eluaten als



auch in den Lysaten keine spezifischen Banden für Hrb1 oder hrb1(S46A) detektiert werden (ohne Abb.). Diese wurde bei etwa 59 kDa für Hrb1-6His (58kDa für natives Hrb1 und 0,84 kDa für 6His) erwartet. Auch die Expression von verschiedenen Gbp2-Mutanten in dem Vektor pQE 60 zeigte ähnliche Probleme (Dr. Merle Windgassen, Prof. Heike Krebber, persönliche Mitteilung). Mit einer Sequenzierung über die Promotorregion der Plasmide (HK100, 4.5.) konnten homologe Rekombinationen in diesem Bereich nachgewiesen werden, so dass eine Expression der Proteine nicht möglich war.

Eine Möglichkeit dafür, warum die Rekombinationen auftraten, könnte sein, dass Hrb1 und hrb1(S46S) toxisch für *E. coli*-Zellen sind und daher Plasmide, in denen die Expression nicht funktioniert durch den Selektionsdruck bevorzugt werden. Für solche Fälle wird vom Hersteller Qiagen geraten, schon die Klonierung in dem Stamm *MI5[pREP4]* durchzuführen, da in diesem durch das enthaltene Plasmid eine höhere Menge an *lacI* produziert wird, was die mögliche Transkription von Genen bereits vor der Induktion mit IPTG noch stärker blockieren soll (Qiagen, 2001).

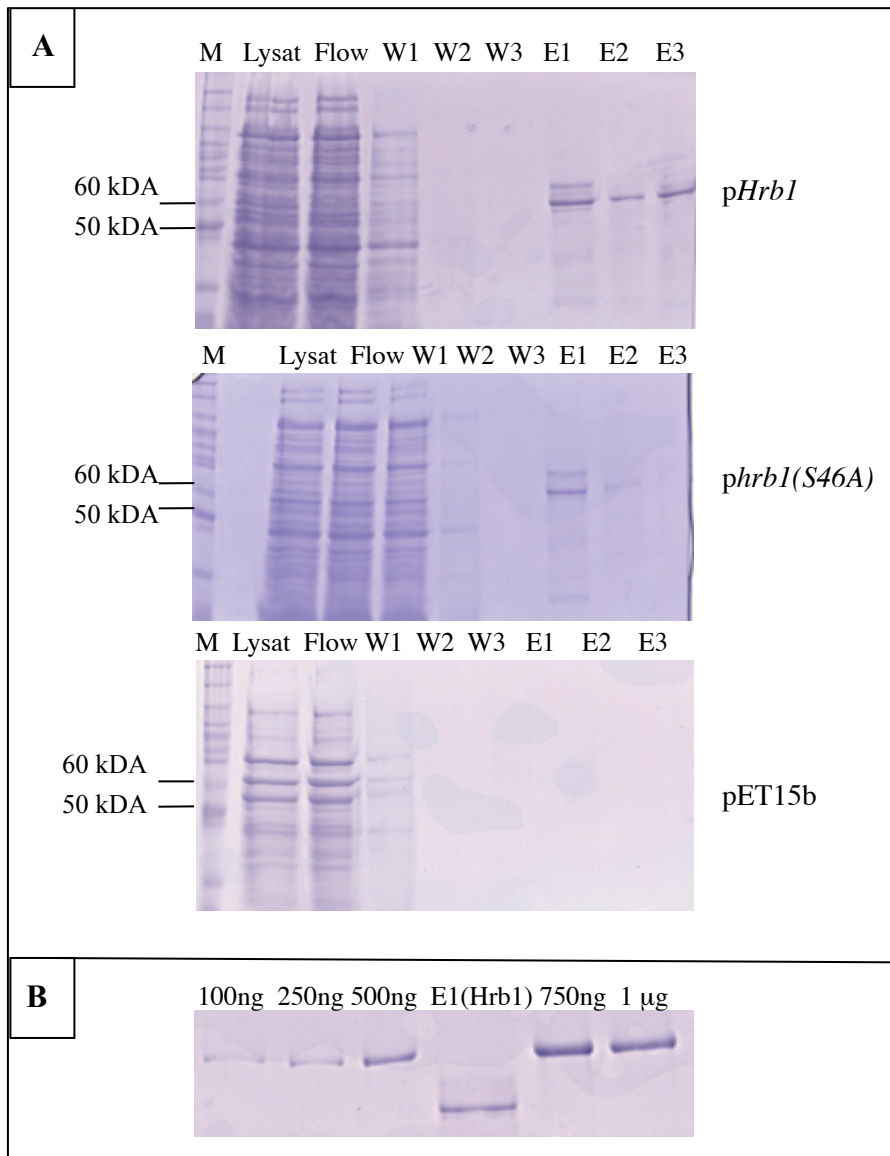
In dieser Arbeit wurde allerdings auf ein anderes Expressionssystem zurückgegriffen: Das pET-System von Novagen bedient sich des T7-Promoters aus dem gleichnamigen Bakteriophagen, der spezifisch von der T7-RNA-Polymerase erkannt wird. Zur Klonierung wurde der *E. coli*-Stamm *JM109* verwendet, da in diesem keine T7-RNA-Polymerase vorkommt und so die frühzeitige Expression der Proteine, möglicherweise schon während der Klonierung, verhindert wird. Die Expression erfolgte im *E. coli*-Stamm *BL21(DE3)*. Hier wird die T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors reguliert. Zusätzlich enthält dieser Stamm das Gen, das für den *lac*-Repressor *lacI* kodiert. Dieser interagiert mit dem *lacUV5*-Promotor in den *BL21(DE3)* Zellen und blockiert die Transkription der T7-RNA-Polymerase in Abwesenheit von IPTG. Des Weiteren bindet er an eine *Lac*-Operon Sequenz, die sich in Richtung des 5'-Endes hinter dem T7-Promotor befindet. Dadurch wird verhindert, dass die Proteine vorzeitig exprimiert werden, sollte T7-RNA-Polymerase dennoch vorhanden sein. Durch Zugabe von IPTG wurde die Expression der Zielgene gestartet. Dieses aktiviert zum einen den *lacUV5*-Promoter, wodurch die T7-RNA-Polymerase exprimiert wird, die wiederum den T7-Promoter aktiviert, was schließlich zur Expression der Zielproteine Hrb1-6His und hrb1(S46A)-6His führt. Zum anderen bindet es den Repressor *lacI*, womit dieser seine hemmende Wirkung auf die Transkription am T7-Promoter nicht mehr ausüben kann (Novagen, 1992).

Zunächst wurden *HRB1* (pHK591) und *hrb1S46A* (pHK582) so in das Plasmid pET-15b kloniert, dass die 6-Histidinreste bei der Translation carboxyterminal an das jeweilige Protein angehängt werden (4.10.13). Zur Analyse der Expression wurde *BL21(DE3)* mit den entsprechenden Plasmide transformiert (4.10.11). Einer 50ml Kultur wurde, wenn sie eine Dichte von OD<sub>600</sub> 0,6-1 erreicht hatte, zum Start der Induktion 1mM IPTG hinzugefügt. Nach 4 Stunden wurde die Induktion durch Zentrifugation und Einfrieren des Zellsniederschlags gestoppt (4.13.1). Am folgenden Tag wurden die Zellen mittels Ultraschallhomogenisation lysiert über Ni-NTA-Säulen aufgereinigt (4.13.2 und 4.13.3). Abb. 17 zeigt, dass Hrb1-6His und hrb(S46A)-6His exprimiert werden konnten. In der Kontrolle, in der nur pET-15b in *BL21(DE3)* verwendet wurde, sind keine Proteine in den Eluaten zu detektieren. Wie erwartet laufen beide Proteine bei etwa 59kDa. Zusätzlich kann bei beiden Proteinen jedoch eine Bande bei etwa 65kDa gefunden werden. Zum einen könnte diese obere Bande eine unspezifische Bindung des *E. coli*-Lysates an die Ni-NTA-Matrix darstellen, oder aber Hrb1 und hrb1(S46A) laufen im SDS-Polyacrylamidgel, bedingt durch eine mögliche Veränderung des Laufverhaltens aufgrund der angehängten Histidine, etwas höher als erwartet. Gegen eine unspezifische Bindung spricht, dass diese Bande in der Leerkontrolle (pET-15b) nicht zu sehen ist. Schwächere Banden unterhalb von 59kDa deuten auf einen möglichen Abbau der exprimierten Proteine an.

Die Menge an exprimiertem Protein war gering. Für eine grobe Mengenbestimmung wurden 20µl des Eluates von Hrb1 (E1) auf einem Gel mit unterschiedlichen Mengen von BSA aufgetragen. Im Vergleich kann für Hrb1 in eine Konzentration von etwa 25-50ng/µl angegeben werden (Abb. 17B).

Gerade für die Produktion von Antikörpern werden sehr viele höhere Mengen von aufgereinigtem Protein gebraucht. Daher wurde versucht durch den Einsatz einer größeren Kultur die Menge an Protein zu erhöhen. Leider konnte mit der angewendeten Methode der Ultraschallhomogenisation keine größeren Mengen erzeugt werden, die über die Ni-NTA Säulen aufgereinigt werden konnten. Mehrmalige Versuche mit veränderten Bedingungen (Erhöhung der Stärke, verlängerte Behandlung mit dem Ultraschallhomogenisator) zeigten keine Besserung.

Da die Gewinnung von spezifischen Antikörpern für Hrb1 aber auch z.B. für Gbp2 das Methodenspektrum zur Aufklärung der Funktion dieser Proteine entscheidend erweitert, erscheint es dennoch sinnvoll die Expression dieser Proteine weiter zu optimieren. Dazu wäre unter anderen das Testen weiterer Expressionssysteme (z.B. über eine Gluthation-



**Abb. 17. Rekombinante Expression von Hrb1 und hrb1(S46A).** A: Die Expression von Hrb1 (pHK591) und hrb(S46A) (pHK582) wurden in *BL21(DE3)*-Zellen nach Zugabe von 1mM IPTG für vier Stunden induziert. Nach Lyse und Aufreinigung wurden Proben zur Detektion einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unterzogen und anschließend wurden die Gele mit Coomassie-Blau gefärbt. pET-15b dient als Leerkontrolle. M: „benchmark protein ladder“ (4.2). „Flow“: 150µl des Zentrifugats nach der Bindung der His-Proteine an die NTA-Matrix. W1,2,3: 150µl des Zentrifugats nach den jeweiligen Waschschritten mit Waschpuffer. E1,2,3: 200µl des Zentrifugats der jeweiligen Elutionen mit Eluationspuffer. Alle Proben wurden mit 1fach SDS-Probenpuffer versetzt. B: Konzentrationsbestimmung von Hrb1 in E1. 20 µl E1 wurden im Vergleich mit verschiedenen Mengen BSA auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht. Die Konzentration von Hrb1 in E1 entspricht etwa 25ng/µl

S-Transferase-Markierung) oder aber alternative Möglichkeiten zur Lyse (z.B. der Einsatz einer „French Press“) sinnvoll.

In einem *in vitro* Kinase Assay konnten Porat und Kollegen Hrb1 als Substrat von Sky1 identifizieren (Porat et al., 2006). Weitere *in vitro* Studien ließen zunächst vermuten, dass Hrb1 durch Sky1 an mehr als nur den 8 Serinresten (S14, S17, S33, S46, S62, S89,

S92, S100) in der SR/RGG Domäne phosphoryliert wird. Lokalisationsstudien von Hrb1 und *hrb1*-Mutationen in der SR/RGG Domäne in Wildtyp und *sky1*-Deletionstämmen zeigten allerdings, dass Hrb1 nicht durch Sky1 phosphoryliert wird, dass die SR/RGG aber wichtig für Lokalisation des Proteins in der Zelle ist (Porat et al., 2006).

## 6 Diskussion

### 6.1 Nab2-Domänen-Tausch

In dieser Arbeit wurde eine nab2-Mutante hergestellt, der die Aminosäurereste AA201 - 249 fehlen. Neben der RGG-Domäne befindet sich in dieser Region auch das NLS von Nab2 (Abb. 5) (Lee und Aitchison, 1999a). In einem thermosensitiven *NAB2* – Deletionsstamm konnte nab2 $\Delta$ 201-249 bei nicht permissiver Temperatur von 14°C funktionelles Nab2 nicht ersetzen (Abb. 6A). Im Gegensatz zu Nab2 war nab2 $\Delta$ 201-249 überwiegend im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 6B) (Anderson et al., 1993; Duncan et al., 2000; Lee und Aitchison, 1999a). Auch die Überexpression des Importrezeptors Kap104 führte nicht zu einer nukleären Lokalisation des mutierten Proteins (Abb. 6B). Durch Transformation in verschiedene Mutationsstämme konnte gezeigt werden, dass nab2 $\Delta$ 201-249 zwischen beiden Kompartimenten pendelt, da es in *rat7-1* und *mex67-5* Zellen (beide Mutationsstämme weisen einen mRNPs-Export Defekt bei nicht-permissiver Temperatur auf (Gorsch et al., 1995; Krebber et al., 1999; Segref et al., 1997)) im Zellkern lokalisiert war (Abb. 7). Des Weiteren kann nab2 $\Delta$ 201-249 den Zellkern auch verlassen, wenn keine funktionelle mRNA vorlag, was sich an der zytoplasmatischen Lokalisation der Mutante bei nicht permissiver Temperatur in *rpb1-1* Zellen zeigte (Abb. 7). Obwohl Mutationen in *mex67-5* und *rat7-1*, Proteine, die den generellen Export aller mRNPs beeinflussen, zu einem Exportdefekt der hier untersuchten nab2-Mutante führten, zeigte sich im *tom1*-Mutationstamm, einem Protein, das spezifisch für den Export von Nab2-assoziierten mRNPs wichtig scheint, kein Export-Defekt von nab2 $\Delta$ 201-249 (Abb. 7). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Export von nab2 $\Delta$ 201-249 ebenfalls nicht von der Expression von Taf145-abhängigen Genen beeinflusst wird, ebenso nicht von den Proteinen Spt6 und Prp8 (Abb. 7). Letzteres ist ein Protein des Spleißosoms, das in dieser Arbeit als möglicher neuer Gbp2p-assoziiierter Faktor identifiziert wurde (5.2.3.2). Mtr4 ist ein weiteres Protein, dass in einem Gbp2 basiertem mRNA Exportscreen identifiziert werden konnten (5.2.3.1), hier ist der Export nab2 $\Delta$ 201-249 zumindest zum Teil blockiert (Abb. 7).

Dass nab2 $\Delta$ 201-249 vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert ist, erscheint nicht ungewöhnlich. Der Bereich AA 201 – 249 wurde eindeutig als funktionelles NLS beschrieben (Lee und Aitchison, 1999a). Wenn einem pendelnden Protein die Sequenz, welche die Kernlokalisation für den Importrezeptor markiert, fehlt, erscheint es

ersichtlich, dass dieses Protein einen erschwerten oder ganz und gar blockierten Import aufweist. Letzteres scheint im Fall von *nab2Δ200-249* nicht der Fall zu sein, da die nukleäre Lokalisation in *rat7-1* und *mex67-5* Zellen beweist, dass irgendeine Art von Import des Proteins stattgefunden haben muss. Gleichzeitig zeigt dies, dass ähnlich wie bei anderen pendelnden mRNA-bindenden Proteinen (z.B. Gbp2 (Windgassen und Krebber, 2003), Hrbp1 (Hacker und Krebber, 2004)) der Export von *nab2Δ201-249* an den Export von mRNA gebunden ist. Im Gegensatz zu diesen zeigte *nab2Δ200-249* allerdings eine zytoplasmatische Lokalisation in *rpb1-1* Zellen, es wird also bei Nichtvorhandensein von mRNA auch aus dem Kern exportiert bzw. dort nicht im Kern gehalten. Es scheint, als ob *nab2Δ200-249* an mRNA wenn diese vorhanden ist, nur über den mRNA-Export auch den Kern verlassen, während es wenn keine mRNA-Transkription stattfindet auch anderen Exportrouten unabhängig von mRNA nutzen kann.

Marfatia und Kollegen konnten für eine von Ihnen hergestellte *nab2*-RGG-Deletions $\Delta$ 201-265-Mutante zeigen, dass diese einen Wachstumsdefekt bei 30°C nicht allerdings bei 18°C und 37°C aufhebt (Marfatia et al., 2003). Ebenso wie die hier vorgestellte  $\Delta$ 200-249-Mutante ist die RGG-Mutante der Kollegen im Gleichgewicht vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert und pendelt trotz verzögertem Import zwischen den Kompartimenten. Diese und unsere Daten sprechen damit dafür, dass es einen von Kap104 unabhängigen Importweg geben muss. Unterstrichen wird dies möglicherweise durch die Tatsache, dass Nab2 ein essentielles Protein ist und Kap104 nicht (Marfatia et al., 2003). Interessanterweise konnten Sie auch zeigen, dass diese Mutante bei 18°C (aber nicht bei 30°C) einem mRNA-Export-Block hervorruft, während es gleichzeitig hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist (Marfatia et al., 2003). Der Export ist also möglicherweise durch den verzögerten Import von *nab2Δ201-265* blockiert. Wir konnten allerdings zeigen, dass *nab2Δ200-249* in *rpb1-1* Zellen ebenfalls eine zytoplasmatische Lokalisation hat, der Export von *nab2Δ200-249* ist als nicht zwingend an mRNA-Export gebunden. Die nukleäre Lokalisation in *mex67-5*- und *rat7-1*-Stämmen hingegen zeigt, dass *nab2Δ200-249*, bei Vorhandensein von mRNA aber nicht stattfindendem Export dieser, im Kern zurückgehalten wird.

In dem *tom1*-Deletionsstamm verhält sich *nab2Δ200-249* nicht wie funktionelles Nab2 (Duncan et al., 2000), es ist im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 7). Ob für den Export von *nab2Δ200-249* beladender mRNAs eine Ubiquitinierung durch Tom1 nicht erforderlich ist, oder ob *nab2Δ200-249* unabhängig von mRNA, wie die zytoplasmatische

Lokalisation in *rpb1-1* vermuten läßt, transport wird, kann nur durch mRNA-Kolokalisationsstudien gezeigt werden. Dagegen spricht allerdings, dass *nab2Δ201-249* in Mutationsstämmen mit generellem mRNA Exportdefekt (*rat7-1* und *mex67-5*) eine nukleäre Lokalisation hat, also nicht exportiert wird.

Solche Deletationsmutanten wie in dieser Arbeit präsentiert, helfen bei funktionellen Untersuchungen von Proteinen. So wurde die von Marfatia und Kollegen publizierte *nab2-ΔRGG* Domäne z.B. 2010 im Rahmen von Arbeiten benutzt, die unter anderem zeigten dass Yra1 die Interaktion von Mex67 und Nab2 stabilisiert (Iglesias et al., 2010).

## 6.2 Identifizierung von Proteinen, die in den Export Gbp2-gebundener mRNAs involviert sind.

In dieser Arbeit wurden 33 temperatursensitive Mutanten auf eine Kernlokalisierung von gbp2(S15A)-GFP untersucht (Tab. 5). Unter diesen 33 konnten fünf Mutanten mit einem mRNA-Export-Defekt isoliert werden (ts 139, ts 150, ts 153, ts 157, ts 160). Für drei dieser Mutanten konnte gezeigt werden, dass zwei oder sogar mehrere Mutationen für den spezifischen Phänotyp von Temperatursensitivität und Kernlokalisierung von gbp2(S15A)-GFP verantwortlich sind. Ts 150, ts 157 und ts 160 wurden daher aussortiert. Für ts 153 gelang es durch Rückkreuzung mit dem isogenen Wildtyp, die Mutationen zu trennen und dabei einen Klon zu isolieren, bei dem eine Einzelmutation den Phänotyp bestimmt. Nur bei ts 139 war schon zu Anfang eine Mutation für beide Phänotypen verantwortlich (5.2.2).

Da Gbp2 nicht essentiell ist, kann man sich vorstellen, dass für einen Defekt, der (wie in den untersuchten Mutanten) zu einem Wachstumsstop führt, nicht nur die Funktion von Gbp2 oder Gbp2-abhängigen mRNAs sondern auch andere, für die Zelle entscheidendere Funktionen gestört sein müssen. Das heißt Faktoren, die nicht nur die Funktion von Gbp2 beeinflussen sondern an wichtigen übergreifenden Stationen während der mRNA-Prozessierung und des mRNA-Exportes beteiligt sind. In dieser Arbeit konnte ein Spleißingfaktor (Prp8) und eine RNA-Helikase (Mtr4) identifiziert werden. Prof. Heike Krebber konnte den Transkriptionsfaktor Spt6 identifizieren. Alle Proteine sind an übergreifenden wichtigen Stationen im Stoffwechselweg der mRNA beteiligt sind.

### 6.2.1 *MRT4* und *PRP8* konnte als Faktoren identifiziert werden, die den Export Gbp2-assoziierte mRNAs verhindern.

Für die ts 139 konnte eindeutig gezeigt werden, dass in dieser ein Defekt in MTR4 zu einem vermehrten Zurückhalten von gbp2(S15A) bzw. von mRNA im Zellkern führt (Abb. 12). Mtr4(„mRNA-Transport“)/Dop1(„depending on eIF4B“) wurden unabhängig voneinander von zwei Arbeitsgruppen beschrieben. Von Liang und Kollegen wurde eine Mutante, *mtr4-1*, beschrieben, die poly(A)-RNA im Zellkern akkumuliert (Liang et al., 1996a). Außerdem ist Mtr4 ein für das Wachstum von *S. cerevisiae* essentieller Faktor und gehört zur Gruppe der DEAD-Box RNA-Helikasen. De la Cruz und Kollegen identifizierte 1998 Dob1 als Kofaktor des Exosoms, der an der



Formation des 3'-Endes von 5.8S rRNA beteiligt ist (De la Cruz et al., 1998). Mittlerweile ist bekannt, dass Mtr4/Dob1 das Exosom bei vielen seiner Funktionen (3'-5'-Prozessierung von rRNAs, snRNAs und snoRNAs) als Kofaktor unterstützt (Allmang et al., 1999; de la Cruz et al., 1998; Mitchell und Tollervey, 2000). Auch bei der Degradation von mRNA durch das Exosom, wirkt Mtr4/Dob1 als Kofaktor. Es scheint daher ersichtlich, dass bei Ausfall dieser Funktion mRNAs, die eigentlich degradiert werden sollten, im Kern akkumulieren (Carneiro et al., 2007; Liang et al., 1996a; Milligan et al., 2005). Dies kann den Phänotyp erklären, der in dieser Arbeit für eine Mutation von *MTR4* beschrieben ist. Da Gbp2 bereits ko-transkriptionell an die mRNAs gebunden wird (Hurt et al., 2004), ist es schon auf den mRNAs vorhanden, die durch das Exosom degradiert werden sollen. Findet diese Degradation nicht statt, akkumulieren die mRNAs im Kern. Trotz Verlust der Funktion des Exosoms verbleiben also mRNAs, die für den Abbau durch das Exosom bestimmt sind, im Kern und werden somit nicht translatiert. Dies impliziert, dass es eine dem Exosom nachgeschaltete Kontrollstation geben muss, welche die mRNAs erkennt, die nicht für den Export bestimmt sind. Wie schon in der Einleitung erwähnt, scheint das Exosom die Menge von vorhandener mRNA zu regulieren (Roth et al., 2005) und damit in das Proteom der Zelle einzugreifen. Dieser Umstand erklärt möglicherweise, warum eine *mtr4*-Mutation erst relativ spät, im Vergleich zu *mex67-5* oder *rat7-1*, Auswirkungen zeigt. Wie Abb. 12. zeigt, sind die Auswirkungen einer *mtr4*-Mutation für Gbp2 gebundene mRNAs erst nach einer Stunde sichtbar. Stellt man sich vor, dass Mtr4, dadurch dass es ein wesentlicher Bestandteil des Exosoms ist, die Menge an mRNA, die exportiert und translatiert werden sollen, reguliert, zeigt sich eine Akkumulation von mRNA im Vergleich zu *mex67-5* oder *rat7-1*, bei denen der gesamte mRNA-Export betroffen ist, erst später. Mtr4 ist „nur“ an dem Abbau bzw. der Regulation von bestimmten mRNA beteiligt, die zu einem bestimmten Zeitpunkt oder während eine Phase abgebaut und damit herunterreguliert werden sollen. So ist es nicht verwunderlich, dass sich eine Akkumulation erst nach einiger Zeit einstellt.

Eine andere Erklärung für das Auftreten von Auswirkungen nach erst einer Stunde, ist, dass Mtr4 einen eher indirekten Einfluss auf den mRNA-Export hat. Es wäre z.B. möglich, dass durch die *mtr4*-Mutation die Prozessierung der rRNA soweit beeinträchtigt wird, dass Translation erschwert statt findet, und dass so über eine Rückkopplung der mRNA-Export blockiert wird. Es ist natürlich auch vorstellbar, dass beide Prozesse zusammen, zu dem in ts 139 gezeigten Phänotyp führen.

Ein dritte Möglichkeit wäre, dass trotz der Mutation die Funktion des Proteins nicht weitestgehend vorhanden ist und sich der mRNA-Export Defekt daher erst langsam auswirkt.

In der Zwischenzeit wurde der TRAMP-Komplex bestehend aus Trf4, Air2 und Mtr4 beschrieben, der mRNAs für den Abbau durch das Exosom kennzeichnet in dem es kurze oligo(A)-Enden an die abzubauende mRNA anhängt (Anderson und Wang, 2009; Houseley und Tollervey, 2009). Dies unterstützt die oben beschriebene Hypothese.

In dieser Arbeit wurde weiterhin mutiertes *prp8* als verantwortlich für den temperatursensitiven Phänotyp von ts 153 identifiziert (Abb. 13B). Es was aus methodischen Gründen war es zum Zeitpunkt der Durchführung der Arbeit nicht möglich zu überprüfen, ob durch Prp8 die Lokalisation von gbp2(S15A) in ts 153 von einer vorwiegend nukleären wieder in zytoplasmatische umwandelt wird. Es erscheint allerdings sehr unwahrscheinlich, dass Prp8 die Temperatursensitivität aufheben sollte, nicht aber die Kernlokalisierung, da ts 153 noch zweimal mit dem isogenen Wildtyp gekreuzt worden. Sowohl nach der zweiten als auch nach der dritten Kreuzung gab es keine Anzeichen, dass mehrere Mutationen vorliegen sollten.

Der Umstand, dass *PRP8* ein verhältnismäßig großes Gen ist, erklärt, warum so viele Plasmidpools getestet werden mussten, um schließlich mit der Bank „C4“ ein Kandidatengen zu finden. In den vier verschiedenen „C-Plasmidbanken“ sind generell die größten DNA-Fragmente aus *S. cerevisiae* enthalten, wohingegen in den Banken A und B im Vergleich kleiner Fragmente enthalten sind (Rose et al., 1987).

Prp8 ist eines der größten und am höchsten konservierten Zellkernproteine, mit einer Aminosäuresequenzhomologie von 61% zwischen *S. cerevisiae* und humanen Zellen. Es bezieht eine entscheidende Rolle im katalytischen Kern des Spleißosoms und ist dort an wichtigen Stoffwechselschritten beteiligt (Grainger und Beggs, 2005). Es ist während beider Spleißschritte genauso präsent wie in dem Post-Spleiß-Komplex, der die herausgeschnittenen Introns enthält. (Grainger und Beggs, 2005).

Es scheint leicht verständlich, dass bei Ausfall von Prp8 nicht korrekt gespleißte mRNA im Zellkern akkumulieren können. Es greifen möglicherweise Kontrollmechanismen, die nicht korrekt gespleißte mRNA erfassen und den Übertritt in das Zytoplasma verindern, was die Translation von falschen Proteinen zur Folge hätte.

Obwohl also eine Erklärung für den Phänotyp, den eine Mutation in *PRP8* in ts 153 hervorruft, schnell gefunden scheint, ist das Auffinden eines Spleißfaktor im Zusammenhang mit „Mislokalisierung“ von Gbp2 oder Gbp2-gebundener mRNA

weiterhin interessant: humane SR-Proteine spielen eine wesentliche Rolle beim Spleißvorgang (Graveley, 2000; Sanford et al., 2003) eine Rolle der SR-ähnlichen Proteine in *S. cerevisiae* (Gbp2, Hrb1 und Npl3) beim Spleißen konnte bisher nicht nachgewiesen werden. In *S. cerevisiae* haben allerdings auch nur etwa 5% der Gene Introns. Prp8 könnte also möglicherweise mit den SR-ähnlichen Proteine interagieren oder in demselben Stoffwechselweg von bestimmter SR-ähnlichen Protein gebundenen RNAs wirken. Diese Theorie wird noch dadurch untermauert, dass eine Deletion von *SKY1* (der SR-Protein spezifischen Kinase in *S. cerevisiae*) „synthetic lethal“ mit verschiedenen *prp8*- und *prp17*-Mutationen ist (Dagher und Fu, 2001) und, dass die humanen SR-Protein-Kinase SRPK1 in einem Komplex isoliert, der auch Prp8 enthielt (Lee et al., 2004). Es bleibt dabei allerdings zu bedenken, dass Sky1 im Gegensatz zu Prp8 ein zytoplasmatisches Protein ist (Siebel et al., 1999).

Neben *PRP8* aus dieser Arbeit wurden im Verlauf in der Arbeitsgruppe noch weitere späte Spleißfaktoren im Zusammenhang mit Gbp2 auf ähnliche Weise identifiziert (*PRP17* und *PRP18*, Hackmann et al., 2014). Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeiten konnten die Kollegen 2014 nachweisen, dass die SR Proteine Gbp2 und Hrb1 eher an ungespleißte, intronhaltiger mRNA binden, während Npl3 eher unspezifisch mRNA bindet. Es konnte eine physikalische Interaktion von Gbp2 und Hrb1 mit den späten Spleißfaktoren Prp17 und Prp43 nachgewiesen werden. Prp8 ist wichtig für den Übergang von früheren zu späteren Schritten des Spleißens. In dem *PRP8*-Mutationsstamm konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Gbp2 und Hrb1 mit Prp17 und auch mit Mex67 reduziert. Gbp2 und Hrb1 binden in späteren Schritten des Spleißens an die mRNA binden und die Assoziation mit dem späten Spleißosom ist wichtig für die Bindung an des Exportfaktor Mex67 und den folgenden Export. Des Weiteren wurde gezeigt, dass falsch oder nicht-gespleißte mRNAs über eine Interaktion mit Mtr4 des TRAMP-Komplexes für das Exosom zum Abbau markieren kann (Hackmann et al., 2014).

### 6.3 Die Toxizität von Gbp2 in Überexpression ist nicht auf ein Zellkompartiment beschränkt

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben Gbp2p auch gbp2(S13/15/17A) (A-Mutante) in Überexpression toxisch für Hefezellen ist (Abb. 16). Da bekannt ist, dass gbp2(S13/15/17A) in erhöhter Konzentration ebenfalls im Zytoplasma lokalisiert ist (Windgassen und Krebber, 2003), lässt sich daraus folgern, dass die Toxizität von Gbp2 in erhöhten Konzentrationen nicht auf die nukleäre Lokalisation beschränkt ist. Des Weiteren wurde eine phosphomimetische Mutante konstruiert (gpb2(S15/17E), pHK525), die eine dauerhafte Phosphorylierung der Serinreste 15/17 vortäuschen sollte. Analog zu dem Modell von Npl3, in dem die Phosphatase Glc7 für eine Dephosphorylierung und damit funktionierenden mRNA-Export verantwortlich ist (Gilbert und Guthrie, 2004), wurde für eine phosphomimetische gbp2-Mutante eine nukleäre Lokalisation erwartet. Überraschender Weise wurde in dieser Arbeit eine zytoplasmatische Lokalisation nachgewiesen, die phosphomimetische Mutanten, zeigt also am ehesten einen Importdefekt (Abb. 15).

Dennoch verbleibt die E-Mutante sowohl bei Fehlen von mRNA (*rpb1-1*) als auch bei gestörten mRNA-export (*rat7-1*) im Zellkern, was auf einen mRNA-abhängigen Export der Mutante hinweist (Abb. 15).

Mögliche Ursachen für die Toxizität der A-Mutante mag eine Funktion von Gbp2 bei der Translation spielen. Etwa 30% von Gbp2 sind noch während der Translation an mRNA gebunden sind (Windgassen et al., 2004). Bereits für Npl3 wurde gezeigt, dass eine Inhibierung der Phosphorylierung von Sky1 an S411 von der mRNA zu einem Translationsdefekt führt (Windgassen et al., 2004). Allerdings scheint Sky1 für die Dissoziation von Npl3 von der mRNA keine Rolle zu spielen, da eine Deletion von *SKY1* keinen Einfluss auf die Dissoziation von Npl3 von den Polysomen hat. Es wird vermutet, dass eine Phosphorylierung durch Sky1 möglicherweise eine unspezifische, erneute Bindung an die mRNA verhindert und so den Import fördert (Windgassen et al., 2004). In ähnlicher Weise könnte auch gbp2(S13/15/17A), von dem bekannt ist, dass es vermehrt an mRNA bindet (Windgassen und Krebber, 2003), den Translationsprozess behindern und sich somit toxisch auf das Wachstum der Zellen auswirken. Wenn gbp2(S13/15/17A) in physiologischen Konzentrationen vorliegt, kann vermehrte Expression von Mtr10 zu einer Lokalisationänderung von gbp2(S13/15/17A) zurück in den Zellkern führen (Windgassen und Krebber, 2003). Liegt gbp2(S13/15/17A) in

Überexpression vor, ist die Kapazität von Mtr10 möglicherweise erschöpft und gbp2(S13/15/17A) kann vermehrt an mRNA binden und die Translation stören, was erklärt, warum gbp2(S13/15/17A) nur im Überexpression toxisch ist.

Unklar ist, warum die E-Mutante eine zytoplasmatische Lokalisation aufweist. Die nukleäre Lokalisation in den temperatursensitiven Mutationsstämmen *rpb1-1* und *rat7-1* spricht dafür, dass kein genereller Importblock vorliegt, ein Import nach der Translation muss stattgefunden haben. Durch die Mutationen könnten die Mtr10-Bindedomäne so verändert sein, dass der Import deutlich verlangsamt ist. Eine andere Erklärung könnte sein, dass Glutaminsäure möglicherweise nicht in der Lage ist, eine dauerhafte Phosphorylierung vorzutauschen. Aspartat ist ebenfalls als phosphomimetische Aminosäure bekannt. Für das Konstrukt  $P_{GALI}:gbp2(S15/17D)$  wurde der Einfluss von gbp2(S15/17D) in Überexpression schon getestet. Es zeigte sich, dass die D-Mutante, wie auch Gbp2 und gbp2(S13/15/17A), in Überexpression einen Wachstumsdefekt aufweisen (Prof. Heike Krebber, persönliche Mitteilung).

Ein gesteigerter Export als Ursache für die vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation erscheint allerdings eher unwahrscheinlich, da schon davon auszugehen ist, dass eine Dephosphorylierung für den effizienten mRNA-Export wesentlich ist. Das dies auch für humane, pendelnde SR-Proteine gezeigt wurde, zeigt dass diese Model hoch konserviert zu sein scheint (Huang et al., 2004b; Serrano et al., 2016).

Ein weiterer Grund für die Toxizität von Gbp2 in Überexpression kommt möglicherweise durch die kürzlich beschriebene, spezifische Funktion von Gbp2 (und Hrb1) als Kontrollfaktoren für nicht-korrekt gespleißte mRNAs (Hackmann, et al. 2014). Falsch gespleißte mRNAs werden über eine Interaktion von Gbp2 und Hrb1 mit dem TRAMP-Komplex für den Abbau durch das nukleäre Exosom markiert. Ein Fehlen von Gbp2 führte zu einem vermehrten Export von fehlerhaft gespleißter mRNA (Hackmann et al, 2014). Im Gegenzug ist vorstellbar, dass ein vermehrtes Vorhandensein von Gbp2 im Zellkern zu einer vermehrten, überschüssigen Markierung von mRNAs für das Exosom führt und damit zu einem übermäßigen Abbau von mRNA und in der Folge zu insuffizienter Translation von Proteinen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aitchison, J. D., Blobel, G., und Rout, M. P. (1996). Kap104p: a karyopherin involved in the nuclear transport of messenger RNA binding proteins. *Science* 274, 624-627.
- Akhtar, A., und Gasser, S. M. (2007). The nuclear envelope and transcriptional control. *Nature reviews Genetics* 8, 507-517.
- Alcazar-Roman, A. R., Tran, E. J., Guo, S., und Went, S. R. (2006). Inositol hexakisphosphate and Gle1 activate the DEAD-box protein Dbp5 for nuclear mRNA export. *Nature cell biology* 8, 711-716.
- Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E., und Tollervey, D. (1999). Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *The EMBO journal* 18, 5399-5410.
- Amberg, D. C., Goldstein, A. L., und Cole, C. N. (1992). Isolation and characterization of RAT1: an essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* required for the efficient nucleocytoplasmic trafficking of mRNA. *Genes & development* 6, 1173-1189.
- Anderson, J. T., und Wang, X. (2009). Nuclear RNA surveillance: no sign of substrates tailing off. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 44, 16-24.
- Anderson, J. T., Wilson, S. M., Datar, K. V., und Swanson, M. S. (1993). NAB2: a yeast nuclear polyadenylated RNA-binding protein essential for cell viability. *Molecular and cellular biology* 13, 2730-2741.
- Andrade, M. A., und Bork, P. (1995). HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nature genetics* 11, 115-116.
- Bachmann, B. J. (1983). Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 7. *Microbiological reviews* 47, 180-230.
- Baierlein, C., Hackmann, A., Gross, T., Henker, L., Hinz, F., und Krebber, H. (2013). Monosome formation during translation initiation requires the serine/arginine-rich protein Npl3. *Molecular and cellular biology* 33, 4811-4823.
- Beck, M., Forster, F., Ecker, M., Plitzko, J. M., Melchior, F., Gerisch, G., Baumeister, W., und Medalia, O. (2004). Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science* 306, 1387-1390.
- Birnboim, H. C., und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7, 1513-1523.
- Bischoff, F. R., Krebber, H., Smirnova, E., Dong, W., und Ponstingl, H. (1995). Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. *The EMBO journal* 14, 705-715.
- Bischoff, F. R., und Ponstingl, H. (1991). Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* 354, 80-82.
- Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G., und Fink, G. R. (1987). 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods in enzymology* 154, 164-175.
- Bossie, M. A., DeHoratius, C., Barcelo, G., und Silver, P. (1992). A mutant nuclear protein with similarity to RNA binding proteins interferes with nuclear import in yeast. *Molecular biology of the cell* 3, 875-893.
- Caceres, J. F., Sreter, G. R., und Krainer, A. R. (1998). A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes & development* 12, 55-66.
- Carneiro, T., Carvalho, C., Braga, J., Rino, J., Milligan, L., Tollervey, D., und Carmo-Fonseca, M. (2007). Depletion of the yeast nuclear exosome subunit Rrp6 results in accumulation of polyadenylated RNAs in a discrete domain within the nucleolus. *Molecular and cellular biology* 27, 4157-4165.

- Cheng, H., Dufu, K., Lee, C. S., Hsu, J. L., Dias, A., und Reed, R. (2006). Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA. *Cell* 127, 1389-1400.
- Chlebowska, A., Lubas, M., Jensen, T. H., und Dziembowski, A. (2013). RNA decay machines: the exosome. *Biochimica et biophysica acta* 1829, 552-560.
- Cingolani, G., Bednenko, J., Gillespie, M. T., und Gerace, L. (2002). Molecular basis for the recognition of a nonclassical nuclear localization signal by importin beta. *Molecular cell* 10, 1345-1353.
- Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K., und Muller, C. W. (1999). Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature* 399, 221-229.
- Clarke, L., und Carbon, J. (1980). Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature* 287, 504-509.
- Colwill, K., Pawson, T., Andrews, B., Prasad, J., Manley, J. L., Bell, J. C., und Duncan, P. I. (1996). The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *The EMBO journal* 15, 265-275.
- Conti, E., Muller, C. W., und Stewart, M. (2006). Karyopherin flexibility in nucleocytoplasmic transport. *Curr Opin Struct Biol* 16, 237-244.
- Cullen, B. R. (2003). Nuclear RNA export. *Journal of cell science* 116, 587-597.
- da Silva, M. R., Moreira, G. A., Goncalves da Silva, R. A., de Almeida Alves Barbosa, E., Pais Siqueira, R., Teixeira, R. R., Almeida, M. R., Silva Junior, A., Fietto, J. L., und Bressan, G. C. (2015). Splicing Regulators and Their Roles in Cancer Biology and Therapy. *BioMed research international* 2015, 150514.
- Dagher, S. F., und Fu, X. D. (2001). Evidence for a role of Sky1p-mediated phosphorylation in 3' splice site recognition involving both Prp8 and Prp17/Slu4. *Rna* 7, 1284-1297.
- de la Cruz, J., Kressler, D., Tollervey, D., und Linder, P. (1998). Dob1p (Mtr4p) is a putative ATP-dependent RNA helicase required for the 3' end formation of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* 17, 1128-1140.
- Del Priore, V., Snay, C. A., Bahr, A., und Cole, C. N. (1996). The product of the *Saccharomyces cerevisiae* RSS1 gene, identified as a high-copy suppressor of the rat7-1 temperature-sensitive allele of the RAT7/NUP159 nucleoporin, is required for efficient mRNA export. *Molecular biology of the cell* 7, 1601-1621.
- Dominguez-Sanchez, M.S., Barroso, S., Gomez-Gonzalez, B., Luna, R., und Aguilera, A. (2011). Genome instability and transcription elongation impairment in human cells depleted of THO/TREX. *PLoS genetics* 7, e1002386.
- Duncan, K., Umen, J. G., und Guthrie, C. (2000). A putative ubiquitin ligase required for efficient mRNA export differentially affects hnRNP transport. *Current biology : CB* 10, 687-696.
- Dunn, E. F., Hammell, C. M., Hodge, C. A., und Cole, C. N. (2005). Yeast poly(A)-binding protein, Pab1, and PAN, a poly(A) nuclease complex recruited by Pab1, connect mRNA biogenesis to export. *Genes & development* 19, 90-103.
- Dworetzky, S. I., Lanford, R. E., und Feldherr, C. M. (1988). The effects of variations in the number and sequence of targeting signals on nuclear uptake. *The Journal of cell biology* 107, 1279-1287.
- Eckner, R., Ellmeier, W., und Birnstiel, M. L. (1991). Mature mRNA 3' end formation stimulates RNA export from the nucleus. *The EMBO journal* 10, 3513-3522.
- Enenkel, C., Blobel, G., und Rexach, M. (1995). Identification of a Yeast Karyopherin Heterodimer That Targets Import Substrate to Mammalian Nuclear Pore Complexes 10.1074/jbc.270.28.16499. *J Biol Chem* 270, 16499-16502.
- Estruch, F. und Cole, C.N. (2003). An early function during transcription for the yeast mRNA export factor Dbp5p/Rat8p suggested by its genetic and physical interactions with transcription factor IIH components. *Molecular biology of the cell* 14, 1664-76.

- Fagotto, F., Gluck, U., und Gumbiner, B. M. (1998). Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin. *Current biology : CB* 8, 181-190.
- Fahrenkrog, B., und Aebi, U. (2003). The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology* 4, 757-766.
- Fischer, T., Rodriguez-Navarro, S., Pereira, G., Racz, A., Schiebel, E., und Hurt, E. (2004). Yeast centrin Cdc31 is linked to the nuclear mRNA export machinery. *Nature cell biology* 6, 840-848.
- Fischer, T., Strasser, K., Racz, A., Rodriguez-Navarro, S., Oppizzi, M., Ihrig, P., Lechner, J., und Hurt, E. (2002). The mRNA export machinery requires the novel Sac3p-Thp1p complex to dock at the nucleoplasmic entrance of the nuclear pores. *The EMBO journal* 21, 5843-5852.
- Floch, A. G., Palancade, B., und Doye, V. (2014a). Fifty years of nuclear pores and nucleocytoplasmic transport studies: multiple tools revealing complex rules. *Methods in cell biology* 122, 1-40.
- Floch, A. G., Palancade, B., und Doye, V. (2014b). Fifty Years of Nuclear Pore and Nucleocytoplasmic Transport Studies: Multiple Tools Revealing Complex Rules. In *Nuclear Pore Complex and Nucleocytoplasmic Transport - Methods*, V. Doye, ed. (Paris: Elsevier), p. 18.
- Fornerod, M., und Ohno, M. (2002). Exportin-mediated nuclear export of proteins and ribonucleoproteins. *Results and problems in cell differentiation* 35, 67-91.
- Fried, H., und Kutay, U. (2003). Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 60, 1659-1688.
- Gadal, O., Strauß, D., Kessel, J., Trumpower, B., Tollervey, D., und Hurt, E. (2001). Nuclear Export of 60S Ribosomal Subunits Depends on Xpo1p and Requires a Nuclear Export Sequence-Containing Factor, Nmd3p, That Associates with the Large Subunit Protein Rpl10p  
10.1128/MCB.21.10.3405-3415.2001. *Mol Cell Biol* 21, 3405-3415.
- Gallardo, M., und Aguilera, A. (2001). A new hyperrecombination mutation identifies a novel yeast gene, THP1, connecting transcription elongation with mitotic recombination. *Genetics* 157, 79-89.
- Gallardo, M., Luna, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., und Aguilera, A. (2003). Nab2p and the Thp1p-Sac3p complex functionally interact at the interface between transcription and mRNA metabolism. *The Journal of biological chemistry* 278, 24225-24232.
- Galy, V., Gadal, O., Fromont-Racine, M., Romano, A., Jacquier, A., und Nehrbass, U. (2004). Nuclear retention of unspliced mRNAs in yeast is mediated by perinuclear Mlp1. *Cell* 116, 63-73.
- Gilbert, W., Siebel, C. W., und Guthrie, C. (2001). Phosphorylation by Sky1p promotes Npl3p shuttling and mRNA dissociation. *Rna* 7, 302-313.
- Gilbert, W., und Guthrie, C. (2004). The Glc7p nuclear phosphatase promotes mRNA export by facilitating association of Mex67p with mRNA. *Molecular cell* 13, 201-212.
- Gilbert, W., Siebel, C. W., und Guthrie, C. (2001). Phosphorylation by Sky1p promotes Npl3p shuttling and mRNA dissociation. *Rna* 7, 302-313.
- Gorlich, D., Henklein, P., Laskey, R. A., und Hartmann, E. (1996). A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus. *The EMBO journal* 15, 1810-1817.
- Gorlich, D., und Kutay, U. (1999). TRANSPORT BETWEEN THE CELL NUCLEUS AND THE CYTOPLASM



- doi:10.1146/annurev.cellbio.15.1.607. Annual Review of Cell and Developmental Biology 15, 607-660.
- Gorsch, L. C., Dockendorff, T. C., und Cole, C. N. (1995). A conditional allele of the novel repeat-containing yeast nucleoporin RAT7/NUP159 causes both rapid cessation of mRNA export and reversible clustering of nuclear pore complexes. The Journal of cell biology 129, 939-955.
- Grainger, R. J., und Beggs, J. D. (2005). Prp8 protein: at the heart of the spliceosome. Rna 11, 533-557.
- Grant, R. P., Marshall, N. J., Yang, J. C., Fasken, M. B., Kelly, S. M., Harreman, M. T., Neuhaus, D., Corbett, A. H., und Stewart, M. (2008). Structure of the N-terminal Mlp1-binding domain of the Saccharomyces cerevisiae mRNA-binding protein, Nab2. Journal of molecular biology 376, 1048-1059.
- Graveley, B. R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. Rna 6, 1197-1211.
- Green, D. M., Marfatia, K. A., Crafton, E. B., Zhang, X., Cheng, X., und Corbett, A. H. (2002a). Nab2p is required for poly(A) RNA export in Saccharomyces cerevisiae and is regulated by arginine methylation via Hmt1p. The Journal of biological chemistry 277, 7752-7760.
- Green, D. M., Marfatia, K. A., Crafton, E. B., Zhang, X., Cheng, X., und Corbett, A. H. (2002b). Nab2p Is Required for Poly(A) RNA Export in Saccharomyces cerevisiae and Is Regulated by Arginine Methylation via Hmt1p 10.1074/jbc.M110053200. J Biol Chem 277, 7752-7760.
- Gross, T., Siepmann, A., Sturm, D., Windgassen, M., Scarcelli, J. J., Seedorf, M., Cole, C. N., und Krebber, H. (2007). The DEAD-box RNA helicase Dbp5 functions in translation termination. Science 315, 646-649.
- Gruter, P., Tabernero, C., von Kobbe, C., Schmitt, C., Saavedra, C., Bachi, A., Wilm, M., Felber, B. K., und Izaurralde, E. (1998). TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. Molecular cell 1, 649-659.
- Gui, J. F., Lane, W. S., und Fu, X. D. (1994). A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. Nature 369, 678-682.
- Häcker, S. (2003). Charakterisierung der SR-Proteine Npl3p, Gbp2p und Hrb1p im nukleo-cytoplasmatischen Transport., 75-77.
- Hacker, S., und Krebber, H. (2004). Differential export requirements for shuttling serine/arginine-type mRNA-binding proteins. The Journal of biological chemistry 279, 5049-5052.
- Hackmann, A., Gross, T., Baierlein, C., und Krebber, H. (2011). The mRNA export factor Npl3 mediates the nuclear export of large ribosomal subunits. EMBO reports 12, 1024-1031.
- Hackmann, A., Wu, H., Schneider, U. M., Meyer, K., Jung, K., und Krebber, H. (2014). Quality control of spliced mRNAs requires the shuttling SR proteins Gbp2 and Hrb1. Nature communications 5, 3123.
- Hammell, C. M., Gross, S., Zenklusen, D., Heath, C. V., Stutz, F., Moore, C., und Cole, C. N. (2002). Coupling of termination, 3' processing, and mRNA export. Molecular and cellular biology 22, 6441-6457.
- Hector, R. E., Nykamp, K. R., Dheur, S., Anderson, J. T., Non, P. J., Urbinati, C. R., Wilson, S. M., Minvielle-Sebastia, L., und Swanson, M. S. (2002). Dual requirement for yeast hnRNP Nab2p in mRNA poly(A) tail length control and nuclear export. The EMBO journal 21, 1800-1810.
- Hellmuth, K., Lau, D. M., Bischoff, F. R., Kunzler, M., Hurt, E., und Simos, G. (1998). Yeast Los1p Has Properties of an Exportin-Like Nucleocytoplasmic Transport Factor for tRNA. Mol Cell Biol 18, 6374-6386.

- Herold, A., Klymenko, T., und Izaurralde, E. (2001). NXF1/p15 heterodimers are essential for mRNA nuclear export in *Drosophila*. *Rna* 7, 1768-1780.
- Hilleren, P., und Parker, R. (2001). Defects in the mRNA export factors Rat7p, Gle1p, Mex67p, and Rat8p cause hyperadenylation during 3'-end formation of nascent transcripts. *Rna* 7, 753-764.
- Ho, J. H.-N., Kallstrom, G., und Johnson, A. W. (2000). Nmd3p Is a Crm1p-dependent Adapter Protein for Nuclear Export of the Large Ribosomal Subunit 10.1083/jcb.151.5.1057. *J Cell Biol* 151, 1057-1066.
- Hodge, C.A., Colot, H.V., Stafford, P. und Cole, C.N. (1999) Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of xpo1-1 cells. *The EMBO journal* 18, 5778-88.
- Holmes, R. K., Tuck, A. C., Zhu, C., Dunn-Davies, H. R., Kudla, G., Clauder-Munster, S., Granneman, S., Steinmetz, L. M., Guthrie, C., und Tollervey, D. (2015). Loss of the Yeast SR Protein Npl3 Alters Gene Expression Due to Transcription Readthrough. *PLoS genetics* 11, e1005735.
- Houseley, J., und Tollervey, D. (2009). The many pathways of RNA degradation. *Cell* 136, 763-776.
- Howard, J. M., und Sanford, J. R. (2015). The RNAissance family: SR proteins as multifaceted regulators of gene expression. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* 6, 93-110.
- Huang, Y., und Carmichael, G. G. (1996). Role of polyadenylation in nucleocytoplasmic transport of mRNA. *Molecular and cellular biology* 16, 1534-1542.
- Huang, Y., Gattoni, R., Stevenin, J., und Steitz, J. A. (2003). SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export. *Molecular cell* 11, 837-843.
- Huang, Y., und Steitz, J. A. (2005). SRprises along a messenger's journey. *Molecular cell* 17, 613-615.
- Huang, Y., Yario, T. A., und Steitz, J. A. (2004a). A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 9666-9670.
- Huang, Y., Yario, T. A., und Steitz, J. A. (2004b). A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export 10.1073/pnas.0403533101. *PNAS* 101, 9666-9670.
- Huber, J., Cronshagen, U., Kadokura, M., Marshallsay, C., Wada, T., Sekine, M., und Luhrmann, R. (1998). Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure. *The EMBO journal* 17, 4114-4126.
- Huertas, P. und Aguilera, A. (2003). Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Molecular cell* 12, 711-21.
- Hurt, E., Luo, M. J., Rother, S., Reed, R., und Strasser, K. (2004). Cotranscriptional recruitment of the serine-arginine-rich (SR)-like proteins Gbp2 and Hrb1 to nascent mRNA via the TREX complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 1858-1862.
- Iglesias, N., und Stutz, F. (2008). Regulation of mRNP dynamics along the export pathway. *FEBS letters* 582, 1987-1996.
- Iglesias, N., Tutucci, E., Gwizdek, C., Vinciguerra, P., Von Dach, E., Corbett, A. H., Dargemont, C., und Stutz, F. (2010). Ubiquitin-mediated mRNP dynamics and surveillance prior to budding yeast mRNA export. *Genes & development* 24, 1927-1938.

- Inoue, H., Nojima, H., und Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Izaurralde, E. (2004). Directing mRNA export. *Nature structural & molecular biology* 11, 210-212.
- Jakel, S., Albige, W., Kutay, U., Bischoff, F. R., Schwamborn, K., Doenecke, D., und Gorlich, D. (1999). The importin beta/importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1. *The EMBO journal* 18, 2411-2423.
- Jakel, S., und Gorlich, D. (1998). Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *The EMBO journal* 17, 4491-4502.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D., und Smith, A. E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39, 499-509.
- Kelly, S. M., Pabitz, S. A., Kitchen, C. M., Guo, P., Marfatia, K. A., Murphy, T. J., Corbett, A. H., und Berland, K. M. (2007). Recognition of polyadenosine RNA by zinc finger proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 12306-12311.
- Kerscher, O., Hieter, P., Winey, M., und Basrai, M. A. (2001). Novel role for a *Saccharomyces cerevisiae* nucleoporin, Nup170p, in chromosome segregation. *Genetics* 157, 1543-1553.
- Kessler, M. M., Henry, M. F., Shen, E., Zhao, J., Gross, S., Silver, P. A., und Moore, C. L. (1997). Hrp1, a sequence-specific RNA-binding protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm, is required for mRNA 3'-end formation in yeast. *Genes & development* 11, 2545-2556.
- Koffa, M. D., Casanova, C. M., Santarella, R., Kocher, T., Wilm, M., und Mattaj, I. W. (2006). HURP is part of a Ran-dependent complex involved in spindle formation. *Current biology : CB* 16, 743-754.
- Kohler, A., und Hurt, E. (2007). Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 761-773.
- Kohler, M., Speck, C., Christiansen, M., Bischoff, F. R., Prehn, S., Haller, H., Gorlich, D., und Hartmann, E. (1999). Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import. *Molecular and cellular biology* 19, 7782-7791.
- Komeno, Y., Huang, Y. J., Qiu, J., Lin, L., Xu, Y., Zhou, Y., Chen, L., Monterroza, D. D., Li, H., DeKelver, R. C., *et al.* (2015). SRSF2 Is Essential for Hematopoiesis, and Its Myelodysplastic Syndrome-Related Mutations Dysregulate Alternative Pre-mRNA Splicing. *Molecular and cellular biology* 35, 3071-3082.
- Krebber, H., Taura, T., Lee, M. S., und Silver, P. A. (1999). Uncoupling of the hnRNP Npl3p from mRNAs during the stress-induced block in mRNA export. *Genes & development* 13, 1994-2004.
- Kuersten, S., Arts, G.-J., Walther, T. C., Englmeier, L., und Mattaj, I. W. (2002). Steady-State Nuclear Localization of Exportin-t Involves RanGTP Binding and Two Distinct Nuclear Pore Complex Interaction Domains. *Mol Cell Biol* 22, 5708-5720. 10.1128/MCB.22.16.5708-5720.2002.
- Kutay, U., Bischoff, F. R., Kostka, S., Kraft, R., und Gorlich, D. (1997). Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* 90, 1061-1071.
- Kutay, U., Lipowsky, G., Izaurralde, E., Bischoff, F. R., Schwarzmaier, P., Hartmann, E., und Gorlich, D. (1998). Identification of a tRNA-Specific Nuclear Export Receptor. *Molecular cell* 1, 359-369.
- la Cour, T., Gupta, R., Rapacki, K., Skriver, K., Poulsen, F. M., und Brunak, S. (2003). NESbase version 1.0: a database of nuclear export signals

- 10.1093/nar/gkg101. Nucl Acids Res 31, 393-396.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- Le Hir, H., Gatfield, D., Izaurralde, E., and Moore, M. J. (2001). The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. The EMBO journal 20, 4987-4997.
- Lee, C. G., Hague, L. K., Li, H., and Donnelly, R. (2004). Identification of toposome, a novel multisubunit complex containing topoisomerase IIalpha. Cell Cycle 3, 638-647.
- Lee, D. C., and Aitchison, J. D. (1999a). Kap104p-mediated nuclear import. Nuclear localization signals in mRNA-binding proteins and the role of Ran and Rna. The Journal of biological chemistry 274, 29031-29037.
- Lee, D. C. Y., and Aitchison, J. D. (1999b). Kap104p-mediated Nuclear Import. NUCLEAR LOCALIZATION SIGNALS IN mRNA-BINDING PROTEINS AND THE ROLE OF RAN AND RNA
- 10.1074/jbc.274.41.29031. J Biol Chem 274, 29031-29037.
- Lee, M. S., Henry, M., and Silver, P. A. (1996). A protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm is an important mediator of RNA export. Genes & development 10, 1233-1246.
- Lei, E. P., Krebber, H., and Silver, P. A. (2001). Messenger RNAs are recruited for nuclear export during transcription. Genes & development 15, 1771-1782.
- Lei, E. P., and Silver, P. A. (2002). Intron status and 3'-end formation control cotranscriptional export of mRNA. Genes & development 16, 2761-2766.
- Lewis, J. D., and Izaurralde, E. (1997). The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export. European journal of biochemistry / FEBS 247, 461-469.
- Liang, S., Hitomi, M., Hu, Y., Liu, Y., and Tartakoff, A. (1996a). A DEAD-box-family protein is required for nucleocytoplasmic transport of yeast mRNA. Mol Cell Biol 16, 5139-5146.
- Liang, S., Hitomi, M., Hu, Y. H., Liu, Y., and Tartakoff, A. M. (1996b). A DEAD-box-family protein is required for nucleocytoplasmic transport of yeast mRNA. Molecular and cellular biology 16, 5139-5146.
- Lim, R. Y., and Fahrenkrog, B. (2006). The nuclear pore complex up close. Current opinion in cell biology 18, 342-347.
- Lukasiewicz, R., Velazquez-Dones, A., Huynh, N., Hagopian, J., Fu, X. D., Adams, J., and Ghosh, G. (2007). Structurally unique yeast and mammalian serine-arginine protein kinases catalyze evolutionarily conserved phosphorylation reactions. The Journal of biological chemistry 282, 23036-23043.
- Lund, M. K., and Guthrie, C. (2005). The DEAD-box protein Dbp5p is required to dissociate Mex67p from exported mRNPs at the nuclear rim. Molecular cell 20, 645-651.
- Macara, I. G. (2001). Transport into and out of the nucleus. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR 65, 570-594, table of contents.
- Marfatia, K. A., Crafton, E. B., Green, D. M., and Corbett, A. H. (2003). Domain analysis of the Saccharomyces cerevisiae heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, Nab2p. Dissecting the requirements for Nab2p-facilitated poly(A) RNA export. The Journal of biological chemistry 278, 6731-6740.
- Martinez-Lumbreras, S., Taverniti, V., Zorrilla, S., Seraphin, B., and Perez-Canadillas, J. M. (2016). Gbp2 interacts with THO/TREX through a novel type of RRM domain. Nucleic acids research 44, 437-448.

- Masuda, S., Das, R., Cheng, H., Hurt, E., Dorman, N., und Reed, R. (2005). Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. *Genes & development* 19, 1512-1517.
- McBride, A. E., Cook, J. T., Stemmler, E. A., Rutledge, K. L., McGrath, K. A., und Rubens, J. A. (2005). Arginine methylation of yeast mRNA-binding protein Npl3 directly affects its function, nuclear export, and intranuclear protein interactions. *The Journal of biological chemistry* 280, 30888-30898.
- Meinel, D.M. und Strasser, K. (2015). Co-transcriptional mRNP formation is coordinated within a molecular mRNP packaging station in *S. cerevisiae*. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 37(6), 666-77.
- Michlewski, G., Sanford, J. R., und Caceres, J. F. (2008). The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. *Molecular cell* 30, 179-189.
- Milligan, L., Torchet, C., Allmang, C., Shipman, T., und Tollervey, D. (2005). A Nuclear Surveillance Pathway for mRNAs with Defective Polyadenylation 10.1128/MCB.25.22.9996-10004.2005. *Mol Cell Biol* 25, 9996-10004.
- Minvielle-Sebastia, L., Preker, P. J., Wiederkehr, T., Strahm, Y., und Keller, W. (1997). The major yeast poly(A)-binding protein is associated with cleavage factor IA and functions in premessenger RNA 3'-end formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 7897-7902.
- Mitchell, P., und Tollervey, D. (2000). Musing on the structural organization of the exosome complex. *Nat Struct Biol* 7, 843-846.
- Moore, M. S., und Blobel, G. (1993). The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* 365, 661-663.
- Nachury, M. V., und Weis, K. (1999). The direction of transport through the nuclear pore can be inverted. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 9622-9627.
- Nakielnny, S., Siomi, M. C., Siomi, H., Michael, W. M., Pollard, V., und Dreyfuss, G. (1996). Transportin: Nuclear Transport Receptor of a Novel Nuclear Protein Import Pathway. *Experimental Cell Research* 229, 261-266.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., und Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-262.
- Novagen (1992). pET System Manual.
- Ossareh-Nazari, B., Bachelier, F., und Dargemont, C. (1997). Evidence for a Role of CRM1 in Signal-Mediated Nuclear Protein Export 10.1126/science.278.5335.141. *Science* 278, 141-144.
- Pasquinelli, A. E., Powers, M. A., Lund, E., Forbes, D., und Dahlberg, J. E. (1997). Inhibition of mRNA export in vertebrate cells by nuclear export signal conjugates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 14394-14399.
- Paulillo, S. M., Phillips, E. M., Koser, J., Sauder, U., Ullman, K. S., Powers, M. A., und Fahrenkrog, B. (2005). Nucleoporin domain topology is linked to the transport status of the nuclear pore complex. *Journal of molecular biology* 351, 784-798.
- Pemberton, L. F., und Paschal, B. M. (2005). Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* 6, 187-198.
- Popa, I., Harris, M. E., Donello, J. E., und Hope, T. J. (2002). CRM1-Dependent Function of a cis-Acting RNA Export Element 10.1128/MCB.22.7.2057-2067.2002. *Mol Cell Biol* 22, 2057-2067.

- Porat, Z., Erez, O., und Kahana, C. (2006). Cellular localization and phosphorylation of Hrb1p is independent of Sky1p. *Biochimica et biophysica acta* 1763, 207-213.
- Qiagen (2001). *The QIAexpressionist. Fifth Edition.*
- Radhakrishnan, A., Nanjappa, V., Raja, R., Sathe, G., Chavan, S., Nirujogi, R. S., Patil, A. H., Solanki, H., Renuse, S., Sahasrabudhe, N. A., *et al.* (2016). Dysregulation of splicing proteins in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer biology & therapy* 17, 219-229.
- Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, E., Jr, Jarnik, M., Engel, A., und Aebi, U. (1990). Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components  
10.1083/jcb.110.4.883. *J Cell Biol* 110, 883-894.
- Ribbeck, K., Groen, A. C., Santarella, R., Bohnsack, M. T., Raemaekers, T., Kocher, T., Gentzel, M., Gorlich, D., Wilm, M., Carmeliet, G., *et al.* (2006). NuSAP, a mitotic RanGTP target that stabilizes and cross-links microtubules. *Molecular biology of the cell* 17, 2646-2660.
- Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H. M., Stewart, M., und Gorlich, D. (1998). NTF2 mediates nuclear import of Ran. *The EMBO journal* 17, 6587-6598.
- Rodriguez-Navarro, S., Fischer, T., Luo, M. J., Antunez, O., Brettschneider, S., Lechner, J., Perez-Ortin, J. E., Reed, R., und Hurt, E. (2004). Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. *Cell* 116, 75-86.
- Qiagen (2001). *The QIAexpressionist. Fifth Edition.*
- Rose, M. D., Novick, P., Thomas, J. H., Botstein, D., und Fink, G. R. (1987). A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector. *Gene* 60, 237-243.
- Roth, K. M., Wolf, M. K., Rossi, M., und Butler, J. S. (2005). The nuclear exosome contributes to autogenous control of NAB2 mRNA levels. *Molecular and cellular biology* 25, 1577-1585.
- Rougemaille, M., Dieppois, G., Kisseleva-Romanova, E., Gudipati, R. K., Lemoine, S., Blugeon, C., Boulay, J., Jensen, T. H., Stutz, F., Devaux, F., und Libri, D. (2008). THO/Sub2p functions to coordinate 3'-end processing with gene-nuclear pore association. *Cell* 135, 308-321.
- Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y., und Chait, B. T. (2000). The Yeast Nuclear Pore Complex: Composition, Architecture, and Transport Mechanism  
10.1083/jcb.148.4.635. *J Cell Biol* 148, 635-652.
- Rout, M. P., und Blobel, G. (1993). Isolation of the yeast nuclear pore complex. *The Journal of cell biology* 123, 771-783.
- Sahebi, M., Hanafi, M. M., van Wijnen, A. J., Azizi, P., Abiri, R., Ashkani, S., und Taheri, S. (2016). Towards understanding pre-mRNA splicing mechanisms and the role of SR proteins. *Gene* 587, 107-119.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., und Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual.*, (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,).
- Sanford, J. R., Longman, D., und Cáceres, J. F. (2003). Multiple roles of the SR protein family in splicing regulation. *Prog Mol Subcell Biol* 31, 33-58.
- Santos-Rosa, H., Moreno, H., Simos, G., Segref, A., Fahrenkrog, B., Pante, N., und Hurt, E. (1998). Nuclear mRNA export requires complex formation between

- Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. *Molecular and cellular biology* 18, 6826-6838.
- Schmid, M., Olszewski, P., Pelechano, V., Gupta, I., Steinmetz, L. M., und Jensen, T. H. (2015). The Nuclear PolyA-Binding Protein Nab2p Is Essential for mRNA Production. *Cell reports* 12, 128-139.
- Schmid, M., Poulsen, M. B., Olszewski, P., Pelechano, V., Saguez, C., Gupta, I., Steinmetz, L. M., Moore, C., und Jensen, T. H. (2012). Rrp6p controls mRNA poly(A) tail length and its decoration with poly(A) binding proteins. *Molecular cell* 47, 267-280.
- Schwartz, T. U. (2005). Modularity within the architecture of the nuclear pore complex. *Current Opinion in Structural Biology* Theory and simulation/Macromolecular assemblages 15, 221-226.
- Segref, A., Sharma, K., Doye, V., Hellwig, A., Huber, J., Luhrmann, R., und Hurt, E. (1997). Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)+ RNA and nuclear pores. *The EMBO journal* 16, 3256-3271.
- Senger, B., Simos, G., Bischoff, F. R., Podtelejnikov, A., Mann, M., und Hurt, E. (1998). Mtr10p functions as a nuclear import receptor for the mRNA-binding protein Npl3p. *The EMBO journal* 17, 2196-2207.
- Serrano, P., Aubol, B. E., Keshwani, M. M., Forli, S., Ma, C. T., Dutta, S. K., Geralt, M., Wuthrich, K., und Adams, J. A. (2016). Directional Phosphorylation and Nuclear Transport of the Splicing Factor SRSF1 Is Regulated by an RNA Recognition Motif. *Journal of molecular biology* 428, 2430-2445.
- Shen, E. C., Henry, M. F., Weiss, V. H., Valentini, S. R., Silver, P. A., und Lee, M. S. (1998). Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes & development* 12, 679-691.
- Shen, E. C., Stage-Zimmermann, T., Chui, P., und Silver, P. A. (2000). The yeast mRNA-binding protein Npl3p interacts with the cap-binding complex. *The Journal of biological chemistry* 275, 23718-23724.
- Sherman, F. (1981). Genetic Nomenclature. In *The Molecular Biology of Yeast Saccharomyces*, J.N. Strathern, E.W. Jones, und J.R. Broach, eds. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 639 - 640.
- Shuman, S. (2001). Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 66, 1-40.
- Siebel, C. W., Feng, L., Guthrie, C., und Fu, X. D. (1999). Conservation in budding yeast of a kinase specific for SR splicing factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 5440-5445.
- Siomi, M. C., Eder, P. S., Kataoka, N., Wan, L., Liu, Q., und Dreyfuss, G. (1997). Transportin-mediated Nuclear Import of Heterogeneous Nuclear RNP Proteins 10.1083/jcb.138.6.1181. *J Cell Biol* 138, 1181-1192.
- Spode, I., Maiwald, D., Hollenberg, C. P., und Suckow, M. (2002). ATF/CREB sites present in sub-telomeric regions of *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes are part of promoters and act as UAS/URS of highly conserved COS genes. *Journal of molecular biology* 319, 407-420.
- Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C., und Weis, K. (1997). Exportin 1 (Crm1p) Is an Essential Nuclear Export Factor. *Cell* 90, 1041-1050.
- Stewart, M. (2007a). Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 195-208.
- Stewart, M. (2007b). Ratcheting mRNA out of the nucleus. *Molecular cell* 25, 327-330.
- Strambio-De-Castillia, C., Niepel, M., und Rout, M. P. (2010). The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 490-501.

- Strasser, K., und Hurt, E. (2000). Yra1p, a conserved nuclear RNA-binding protein, interacts directly with Mex67p and is required for mRNA export. *The EMBO journal* 19, 410-420.
- Strasser, K., und Hurt, E. (2001). Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. *Nature* 413, 648-652.
- Suntharalingam, M., Alcazar-Roman, A. R., und Wentz, S. R. (2004). Nuclear export of the yeast mRNA-binding protein Nab2 is linked to a direct interaction with Gfd1 and to Gle1 function. *The Journal of biological chemistry* 279, 35384-35391.
- Thyagarajan, A., Strong, M. J., und Szaro, B. G. (2007). Post-transcriptional control of neurofilaments in development and disease. *Exp Cell Res* 313, 2088-2097.
- Tieg, B., und Krebber, H. (2013). Dbp5 - from nuclear export to translation. *Biochimica et biophysica acta* 1829, 791-798.
- Tran, E. J., Zhou, Y., Corbett, A. H., und Wentz, S. R. (2007). The DEAD-box protein Dbp5 controls mRNA export by triggering specific RNA:protein remodeling events. *Molecular cell* 28, 850-859.
- Truant, R., und Cullen, B. R. (1999). The Arginine-Rich Domains Present in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat and Rev Function as Direct Importin beta - Dependent Nuclear Localization Signals. *Mol Cell Biol* 19, 1210-1217.
- Truant, R., Fridell, R. A., Benson, E. R., Herold, A., und Cullen, B. R. (1998). Nucleocytoplasmic shuttling by protein nuclear import factors. *Eur J Cell Biol* 77, 269-275.
- Tsukihashi, Y., Miyake, T., Kawaichi, M., und Kokubo, T. (2000). Impaired Core Promoter Recognition Caused by Novel Yeast TAF145 Mutations Can Be Restored by Creating a Canonical TATA Element within the Promoter Region of the TUB2 Gene  
10.1128/MCB.20.7.2385-2399.2000. *Mol Cell Biol* 20, 2385-2399.
- Vinciguerra, P., Iglesias, N., Camblong, J., Zenklusen, D., und Stutz, F. (2005). Perinuclear Mlp proteins downregulate gene expression in response to a defect in mRNA export. *The EMBO journal* 24, 813-823.
- Wang, H. Y., Lin, W., Dyck, J. A., Yeakley, J. M., Songyang, Z., Cantley, L. C., und Fu, X. D. (1998). SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *The Journal of cell biology* 140, 737-750.
- Weirich, C.S., Erzberger, J.P., Berger, J.M. und Weis, K. (2004) The N-terminal domain of Nup159 forms a beta-propeller that functions in mRNA export by tethering the helicase Dbp5 to the nuclear pore. *Molecular cell* 16, 749-60.
- Weirich, C. S., Erzberger, J. P., Flick, J. S., Berger, J. M., Thorner, J., und Weis, K. (2006). Activation of the DExD/H-box protein Dbp5 by the nuclear-pore protein Gle1 and its coactivator InsP6 is required for mRNA export. *Nature cell biology* 8, 668-676.
- Weis, K. (2003). Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* 112, 441-451.
- Wentz, S. R., und Rout, M. P. (2010). The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a000562.
- Wiegand, H. L., Coburn, G. A., Zeng, Y., Kang, Y., Bogerd, H. P., und Cullen, B. R. (2002). Formation of Tap/NXT1 heterodimers activates Tap-dependent nuclear mRNA export by enhancing recruitment to nuclear pore complexes. *Molecular and cellular biology* 22, 245-256.
- Windgassen, M., und Krebber, H. (2003). Identification of Gbp2 as a novel poly(A)+ RNA-binding protein involved in the cytoplasmic delivery of messenger RNAs in yeast. *EMBO reports* 4, 278-283.



- Windgassen, M., Sturm, D., Cajigas, I. J., Gonzalez, C. I., Seedorf, M., Bastians, H., und Krebber, H. (2004). Yeast shuttling SR proteins Npl3p, Gbp2p, and Hrb1p are part of the translating mRNPs, and Npl3p can function as a translational repressor. *Molecular and cellular biology* 24, 10479-10491.
- Winston, F., Dollard, C., und Ricupero-Hovasse, S. L. (1995). Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast* 11, 53-55.
- Yoh, S. M., Cho, H., Pickle, L., Evans, R. M., und Jones, K. A. (2007). The Spt6 SH2 domain binds Ser2-P RNAPII to direct Iws1-dependent mRNA splicing and export. *Genes & development* 21, 160-174.
- Yokoya, F., Imamoto, N., Tachibana, T., und Yoneda, Y. (1999). beta-catenin can be transported into the nucleus in a Ran-unassisted manner. *Molecular biology of the cell* 10, 1119-1131.
- Yokoyama, N., Hayashi, N., Seki, T., Pante, N., Ohba, T., Nishii, K., Kuma, K., Hayashida, T., Miyata, T., Aebi, U., und et al. (1995). A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4. *Nature* 376, 184-188.
- Yoshida, T., Kim, J. H., Carver, K., Su, Y., Weremowicz, S., Mulvey, L., Yamamoto, S., Brennan, C., Mei, S., Long, H., et al. (2015). CLK2 Is an Oncogenic Kinase and Splicing Regulator in Breast Cancer. *Cancer research* 75, 1516-1526.
- Yun, C. Y., und Fu, X. D. (2000). Conserved SR protein kinase functions in nuclear import and its action is counteracted by arginine methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* 150, 707-718.
- Zenklusen, D., Vinciguerra, P., Wyss, J. C., und Stutz, F. (2002). Stable mRNP formation and export require cotranscriptional recruitment of the mRNA export factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p. *Molecular and cellular biology* 22, 8241-8253.
- Zhong, X. Y., Wang, P., Han, J., Rosenfeld, M. G., und Fu, X. D. (2009). SR proteins in vertical integration of gene expression from transcription to RNA processing to translation. *Molecular cell* 35, 1-10.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungen

|         |  |
|---------|--|
| A       | Adenin   |
| AA      | Aminosäuren  |
| A.dest. | Aqua destillata  |
| abs.    | absolut  |
| Amp     | Ampicillin   |
| APS     | Ammoniumpersulfat  |
| bp      | Basenpaar  |
| BSA     | Rinderserumalbumin   |
| Bzw.    | beziehungsweise  |
| CIAP    | Calf Intestinal Alkaline Phosphatase                               |
| d-      | Desoxy-  |
| DAPI    | 4',6-Diamidino-2-phenylindol                                       |
| DMSO    | Dimethylsulfoxid   |
| DNA     | Desoxyribonukleinsäure   |
| dNTP    | Desoxyribonukleotidtriphosphat                                     |
| DTT     | Dithiothreitol   |
| dsDNA   | Doppelsträngige DNA  |
| EDTA    | Ethylendiamintetraessigsäure                                       |
| g       | Erdbeschleunigung  |
| GFP     | grün-fluoreszierendes Protein                                      |
| IPTG    | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid                               |
| Km      | Kanamycin  |
| LB      | Luria Bertani-Medium   |
| min     | Minuten  |
| mRNA    | Boten(„ <u>m</u> essenger“)-Ribonukleinsäure,                      |
| nt      | Nukleotide   |
| NPC     | Kernporenkomplex („ <u>n</u> uclear <u>p</u> ore <u>c</u> omplex“) |

|       |   |
|-------|---|
| NUP   | Nukleoporin   |
| NTA   | „ <u>n</u> itrilo <u>t</u> ri <u>a</u> cetic acid“      |
| OD    | Optische Dichte   |
| PAGE  | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                         |
| PEG   | Polyethylenglykol                                       |
| PCI   | Phenol-Chloroform-Isopropylalkohol                      |
| PCR   | Polymerasekettenreaktion                                |
| RNA   | Ribonukleinsäure  |
| RT    | Raumtemperatur  |
| s.a.  | siehe auch  |
| SDS   | Natriumdodecylsulfat                                    |
| SSC   | Standart-Saline-Citrat                                  |
| TAE   | Tris-Acetat-EDTA  |
| TB    | Transformationspuffer                                   |
| TE    | Tris-EDTA   |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin                      |
| Tris  | Trishydroxamethylaminmethan                             |
| tRNA  | Transfer-Ribonukleinsäure                               |
| v/v   | Volumen per Volumen                                     |
| w/v   | Gewicht per Volumen                                     |
| U     | Enzymeinheit  |
| ÜN    | über Nacht  |
| UpM   | Umdrehungen pro Minute                                  |
| UV    | Ultraviolett  |
| X-Gal | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid |

## **8.2 Verzeichnis akademischer Lehrer**

### **Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:**

Adamkiewicz, Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Bastians, Baum, Baumann, Becker, Behr, Berger, Bien, Büch, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Dünne, Dominguez, Duda, Eberhart, Eilers, Elsässer, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Frenking, Fuchs, Garten, Garrel, Geks, Gerke, Gerdes, Gotzen, Görg, Grimm, Griss, Grundmann, Grzeschik, Gudermann, Hertl, Hoyer, Jungclas, Kann, Kanngiesser, Klenk, Koolman, Krebber, Krieg, Kroll, Kühnert, Lang, Lenz, Lill, Loeffler, Lohoff, Mandrek, Maier, Maisch, Mann, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Pagenstecher, Remschmidt, Renke, Renz, Richter, Röhm, Rosenow, Rothmund, Schäfer, Schnabel, Schrader, Schmidt, Sekundo, Sommer, Schneider, Steininger, Stiewe, Stiletto, Stiller, Sure, Tebbe, Vogelmeier, Voigt, Vogt, Wagner, Weihe, Weiler, Werner, Wulf.

### **Meine akademischen Lehrer in Kassel waren die Damen und Herren:**

Neuzner, Pausch, Wolf, Ritter.

### **Meine akademischen Lehrer in Zug (Schweiz) waren die Damen und Herren:**

Krayer.

### **Meine akademischen Lehrer in Hereford (England) waren die Damen und Herren:**

Corder, Donnelly.

### 8.3 Danksagung

Mein erster Dank gilt ganz ausdrücklich Frau Prof. Dr. Heike Krebber für die unkomplizierte Annahme als Doktorandin und die freundliche Aufnahme in ihrer Arbeitsgruppe. Ich danke ihr für die engagierte Betreuung und geduldige Beantwortung vieler Fragen und motivierenden Diskussionen. Vielen Dank auch die Anfertigung des Gutachtens.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Rolf Müller für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die guten Arbeitsmöglichkeiten im Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung in Marburg.

Ein großes Dankeschön vor allem an meine Kollegen/-innen Ulrike Beyer, Thomas Groß, Sabine Häcker, Alexander Kurz, Andreas Rösser, Dorothée Sturm und Merle Windgassen für die offene und hilfsbereite Zusammenarbeit und für die vielen freundschaftlichen und aufbauenden Worte im und außerhalb des Labors. Sabine Häcker und Merle Windgassen insbesondere für das geduldige Einarbeiten. Alexandra Hackmann danke ich dafür, dass sie Teile meiner Arbeit aufgegriffen hat und somit Gbp2 und Hrb1 eine neue Funktion zuordnen konnte.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Müller gilt mein Dank für die sehr nette Zusammenarbeit, das freundliche Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft. Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Holger Bastians und Anne Kienitz und Celia Vogel aus seiner Arbeitsgruppe für die vielen nützlichen Ratschläge auch im Rahmen meiner Projektpräsentationen und auch für die netten Abende außerhalb des Labors. Frau Ulrike Schülke danke ich für die Unterstützung in organisatorischen Fragen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Roland Lill aus dem Institut für Zytobiologie und Zytopathologie in Marburg für das Überlassen von Plasmiden und Bakterienstämmen.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei meinen Freunden, die mir immer Rückhalt gegeben haben, mich immer unterstützt haben und mich vor allem in arbeitsreichen Zeiten nicht aufgegeben haben. Stefanie Wiegmann, für eine sehr lange Freundschaft. Den Hubi-Mädels und Jungs: Jennifer Rehnelt, Angela Nagel, Daniel Birker, Mirjam Peter und Karina Guttek dafür, dass ich nicht gemieden wurde, obwohl ich auf die andere Seite gewechselt habe. Meiner Marburger Familie: Maria Sommer, Iris Schulte, Elisabeth Wächter, Anna Dillmann-Gleixner, Britta Zerbian und Liseta Koliva. Lucy Eddowes, Silke Kues, Hardy Reinink, Grischa Savoca, Micha Savoca, Kai Balkhausen, Katrin Reinery und Liseta Koliva danke ich für einen Urlaub mit viel Papier und gutem Essen.

Von ganzem Herzen danke ich schließlich meiner Familie für ihre uneingeschränkte

und bedingungslose Unterstützung in allen Lebenslagen: Bernhard, Birgit, Anna, Thomas, Steffi, Piet, Theo, Daniel, Steffi, Tobias, Anna und Lena. Danke!

Außerdem vielen Dank für verschiedenartigste Unterstützung an alle, die mir geholfen haben und hier vergessen wurden.